



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑯ **Offenlegungsschrift**

⑯ **DE 196 39 601 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:

C 12 N 7/01

C 12 N 7/04

C 12 N 15/63

C 12 N 15/39

C 07 H 21/04

A 61 K 39/275

⑯ Aktenzeichen: 196 39 601.8

⑯ Anmeldetag: 26. 9. 96

⑯ Offenlegungstag: 4. 9. 97

DE 196 39 601 A 1

⑯ Innere Priorität:

196 07 458.4 28.02.96

⑯ Anmelder:

Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

⑯ Erfinder:

Schmeer, Norbert, Dr., 42781 Haan, DE; Strube, Walter, Dipl.-Biol. Dr., 50259 Pulheim, DE; Büttner, Mathias, Dr., 72076 Tübingen, DE; Rziha, Hans-Joachim, Dipl.-Biol. Dr., 50858 Köln, DE

⑯ Parapockenviren, die Fremd-DNA enthalten, ihre Herstellung und ihre Verwendung in Impfstoffen

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinant hergestellte Parapockenviren, die im Genom Deletionen oder Insertionen in Form von fremder Erbinformation tragen und Erbinformationen enthalten, die Herstellung solcher Konstrukte sowie ihre Verwendung in Vakzinen.

DE 196 39 601 A 1

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind rekombinante Parapockenviren, ihre Herstellung und Impfstoffe, die sie enthalten.

5 Die erfindungsgemäßen gentechnisch veränderten Parapockenviren tragen in ihrem Genom Deletionen und/oder Insertionen. Die Deletion von Genomabschnitten der Parapockenviren und/oder die Insertion von Fremd-DNA führt, falls erforderlich, zu Reduktion bzw. zum Verlust ihrer Pathogenität (Attenuierung). Durch Insertionen werden Erbinformationen, die Erreger repräsentieren oder für andere biologisch wirksame Substanzen kodieren, in das Genom der Parapockenviren eingebaut. Diese fremden Erbinformationen werden zur Expression, beispielsweise in Zellkulturen, Geweben oder in intakten Organismen, gebracht.

10 Die erfindungsgemäß hergestellten rekombinanten Parapockenviren werden als Vakzine eingesetzt. Die Insertionen in das Genom der Parapockenviren lösen im Impfling eine Abwehrreaktion gegen die Erreger aus, die durch die fremde Erbinformation repräsentiert werden. Zusätzlich werden die allgemeinen Abwehrkräfte des Impflings gesteigert (Im folgenden wird der Begriff Parapockenviren durch PPV abgekürzt.)

15 Parapockenviren selbst können immunmodulatorisch wirken, da sie nicht-erregerspezifische Immunreaktionen im Organismus stimulieren. So werden Präparationen aus Parapockenviren beispielsweise in der Tiermedizin zur Steigerung der allgemeinen Abwehrkräfte erfolgreich eingesetzt. Vakzinen, die auf Basis von rekombinanten Parapockenviren hergestellt werden, können somit als biologische Produkte für eine verbesserte Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt werden, da sie sowohl eine langanhaltende, erregerspezifische 20 Immunität aufbauen als auch einen sehr schnell eintretenden erregerunspezifischen Schutz im Organismus induzieren.

25 So wird beispielsweise eine Präparation von Parapoxvirus ovis (Baypamun®, Bayer AG, Leverkusen) erfolgreich in der Tiermedizin zur Steigerung der allgemeinen Abwehrkräfte gegen Infektionskrankheiten eingesetzt. Diese basiert auf dem PPV-Stamm D1701 im folgenden durch D1701 abgekürzt. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Baypamun zeigten, daß verschiedene Fraktionen des körpereigenen Abwehrsystems auf zellulärer und auf humoraler Ebene stimuliert werden. Infektionsversuche mit verschiedenen Zieltieren verifizierten die Schutzwirkung dieses Immunmodulators gegen verschiedene Infektionskrankheiten. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Schutzwirkung sehr schnell nach der Behandlung eintritt, aber nur für eine relativ kurze Zeit, d. h. in der Regel 1 Woche, andauert.

30 Vakzinen, die erregerspezifisch wirken, benötigen dagegen in Abhängigkeit des Antigens für die Etablierung des Schutzes mehrere Tage bis Wochen, bieten aber dann einen langen, über Monate bis Jahre anhaltenden Schutz.

35 Die Kombination des immunmodulatorischen Prinzips der Parapockenviren mit Antigenen, die einen erregerspezifischen Schutz induzieren ist neu und erlaubt somit die Herstellung von Produkten, die sowohl einen schnell einsetzenden, breiten erregerunspezifischen Schutz gegen Infektionen vermitteln als auch einen langanhaltenden, erregerspezifischen Infektionsschutz bieten.

40 Die Familie der Vertebraten-Pockenviren (Chordopoxvirinae) wird in einzelne, eigenständige Gattungen (Genera) unterteilt. Die vorliegende Erfindung betrifft die Gattung der Parapockenviren, die sich sowohl strukturell als auch genetisch von den übrigen Pockenviren unterscheiden lassen. Die Parapockenviren werden in drei verschiedene Spezies eingeteilt (Lit. #1):

- Parapoxvirus ovis (auch Ecthyma Contagiosum Virus, Virus der Kontagiösen Pustulardermatitis oder Orf Virus genannt), das als Prototyp des Genus gilt,
- Parapoxvirus bovis 1 (auch Bovine Papulöse Stomatitis Virus oder Stomatitis Papulosa Virus genannt) und
- 45 — Parapoxvirus bovis 2 (auch Euterpocken Virus, Paravaccinia Virus, Pseudokuhpocken Virus oder Melkerknoten Virus genannt).

50 Es sind auch Parapockenvirus-Vertreter beschrieben, die aus Kamelen, Rothirschen, Gamsen, Robben, Seehunden, Seelöwen und Eichhörnchen isoliert wurden. Ob es sich hierbei um eigenständige Spezies innerhalb der Gattung Parapockenviren oder um Isolate der oben beschriebenen Spezies handelt, ist noch nicht endgültig geklärt.

55 Infektionen mit Parapockenviren können Erkrankungen beim Tier und beim Menschen (Zoonose-Erreger) hervorrufen. Lit. #1 gibt einen Überblick über die bislang beschriebenen Krankheitsbilder. Die Bekämpfung der Erkrankungen ist möglich durch den Einsatz von prophylaktischen Maßnahmen, wie beispielsweise Vakzinen. Die bislang erhältlichen Vakzinen, die ausschließlich auf Basis von Parapoxvirus ovis entwickelt wurden, zeigen allerdings nur eine unbefriedigende Wirksamkeit (Lit. #2).

60 Die Kenntnisse über die Organisation des Genoms von Parapockenviren beschränken sich derzeit auf die Bestimmungen der Größe des Genoms, den Guanin- und Cytosin-Gehalt der Nukleinsäure, vergleichende Restriktionsenzym-Analysen, die Klonierung einzelner Genomfragmente, Sequenzanalysen von Teilbereichen und hieraus resultierende limitierte Beschreibung von einzelnen Virus-Genen (zur Übersicht Lit. #1, Lit. #6). Unter anderem ist von Lyttle et al. (Lit. #6) ein VEGF-Gen beschrieben, dessen genaue Funktion aber nicht bekannt ist.

65 Rekombinante Parapockenviren oder Teile dieser Viren, die über rekombinante Nukleinsäuren in biologischen Systemen exprimiert werden, bieten die Möglichkeit für die Entwicklung von verbesserten Parapockenvirus-Vakzinen. Die vorliegende Erfindung betrifft daher verbesserte Parapockenvirus-Vakzinen.

Gegenstand der Erfindung ist es auch, das Parapockenvirus als Träger (Vektor) von fremder genetischer Information, die über das Virus exprimiert wird, zu nutzen. Vektoren auf Basis von Parapockenviren wurden

zwar theoretisch in der Literatur diskutiert, aber bisher aufgrund technischer Schwierigkeiten noch nicht realisiert. So ist beispielsweise noch nicht bekannt, in welche Stellen des Genoms von Parapockenviren eine Insertion von Fremd-DNA und deren Expression möglich ist. Die Versuche, wie bei Orthopockenviren das Gen für Thymidinkinase als Insertionsstelle auch bei Parapockenviren zu nutzen, brachten keine Ergebnisse. Mazur und Mitarbeiter (Lit. # 3) beschreiben zwar die Identifizierung eines Genomabschnittes von Parapockenviren, der Ähnlichkeiten mit dem Thymidinkinase-Gen von *Vaccinia Virus* (ein Orthopockenvirus) haben soll, eigene umfangreiche Untersuchungen konnten allerdings die Existenz eines solchen Gens bei Parapockenviren nicht bestätigen. Auch andere Autoren (Lit. # 1) konnten ein Thymidinkinase-Gen bei Parapockenviren nicht finden. Robinson und Lyttle geben zwar 1992 an, daß sie alternative Insertionstellen auf dem Genom von Parapockenviren finden konnten (Lit. # 1), eine Beschreibung dieser Stellen wurde aber nicht gegeben. Bis heute erfolgte keine Beschreibung einer erfolgreichen Anwendung von Parapockenviren als Vektoren.

Pockenviren auf Basis von Avipox-, Capripox-, Swinepox- und Raccoonpoxviren oder *Vaccinia Virus* sind als Vektoren zur Übertragung von fremder genetischer Information bereits beschrieben. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können nicht auf Parapockenviren übertragen werden. Wie vergleichende Untersuchungen immer wieder gezeigt haben, gibt es morphologische, strukturelle und genetische Unterschiede zwischen den einzelnen Gattungen der Pockenviren. So lassen sich beispielsweise die Parapockenviren mit serologischen Methoden von den anderen Gattungen der Pockenviren unterscheiden, was auf unterschiedliche Proteinmuster und damit verbunden auf unterschiedliche Erbinformationen zurückzuführen ist. Einige Vertreter der Pockenviren haben beispielsweise die Fähigkeit zur Agglutination von Erythrocyten. Diese Aktivität wird über ein Oberflächenprotein vermittelt, das sogenannte Haemagglutinin (HA). Das Gen für HA wird als Insertionsstelle für Fremd-DNA bei *Vaccinia Virus*, das zur Gattung der Orthopockenviren gehört, benutzt. Parapockenviren haben diese Aktivität nicht. Weiterhin werden bei den Gattungen Avipox und Orthopox bevorzugt das Gen, das für die Thymidinkinase (TK) kodiert, als Insertionsstelle für Fremd-DNA benutzt. Eigene Untersuchungen und Versuche anderer Autoren (Lit. # 1) zeigten, daß dieses Gen bei Parapockenviren gar nicht existiert, und somit auch nicht als Insertionsstelle genutzt werden kann. Die Fülle an Erkenntnissen, die bei anderen Pockenviren zur Verfügung steht, kann somit nicht auf die Parapockenviren übertragen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind

1. Rekombinant hergestellte Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen.
2. Rekombinant hergestellte Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen in Genomabschnitten, die nicht für die Virusvermehrung notwendig sind.
3. Rekombinant hergestellte Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen in Genomabschnitten, die für die Virusvermehrung notwendig sind.
4. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen in den Bereichen des Hind III-Fragment I aus D1701 enthalten, die nicht exprimiert werden.
5. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen in den Bereichen des Hind III-Fragment I aus D1701 enthalten, die exprimiert werden.
6. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß 1 bis 5, wobei Insertionen und/oder Deletionen im Hind III-Fragment I des D1701 oder in der diesem Fragment entsprechenden DNA aus anderen Parapockenviren lokalisiert sind.
7. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des VEGF-Gens oder benachbart zu diesem enthalten.
8. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des PK-Gens oder benachbart zu diesem enthalten.
9. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des ITR-Ab schnittes oder benachbart zu diesem enthalten.
10. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich oder benachbart des Gens, das für das 10 KDa-Protein kodiert, enthalten.
11. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des Gens HD1R oder benachbart zu diesem enthalten.
12. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des F9L-Gens oder benachbart zu diesem enthalten.
13. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701 oder diesem Fragment entsprechende DNA aus anderen Parapockenviren.
14. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen enthält in Bereichen, die für die Virusreplikation notwendig sind.
15. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in Bereichen, die nicht für Virusreplikation notwendig sind, enthält.
16. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in den Bereichen enthält, die nicht für die Virusreplikation notwendig sind und die auf Bereichen liegen, die nicht exprimiert werden.
17. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in den Bereichen enthält, die nicht für die Virusvermehrung notwendig sind und die auf Bereichen liegen, die exprimiert werden.
18. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das im oder benachbart zum VEGF-Gen dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.
19. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das im oder benachbart zum PK-Gen dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.

DE 196 39 601 A1

20. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das im oder benachbart zum ITR-Abschnitt dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.

21. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus D1701, das im oder benachbart zum Gen HD1R und/oder F9L-Gen Deletionen und/oder Insertionen enthält.

5 22. Plasmid enthaltend DNA-Fragment aus D1701, das im oder benachbart zum Gen, das für das 10 KDa-Protein kodiert, Deletionen und/oder Insertionen enthält.

23. Plasmid enthaltenden Teil des Hind III-Fragment I aus D1701, in welchem Deletionen und/oder Insertionen gemäß 13 bis 22 enthalten sind.

10 24. Plasmid gemäß 13 bis 23, wobei das DNA-Fragment aus D1701 durch eine diesem Fragment entsprechende DNA aus anderen Parapockenviren ersetzt ist.

25. Plasmid gemäß 13 bis 24, wobei das Hind III-Fragment I vollständig oder nur zum Teil vorliegt.

15 26. Genomfragment Hind III-Fragment I von D1701 oder Teile davon oder der diesem Fragment entsprechende Fragmente aus anderen Parapockenviren mit der Sequenz gemäß Sequenz Protokoll ID8.

27. DNA-Abschnitt oder Teile davon aus dem Hind III-Fragment I von D1701 oder der diesem Abschnitt oder Teile davon entsprechende Abschnitt aus anderen Parapockenviren, der für VEGF-Protein kodiert gemäß Sequenz Protokoll ID1.

28. DNA-Abschnitt oder Teile davon aus dem Hind III-Fragment I von D1701 oder der diesem Abschnitt oder Teile davon entsprechende Abschnitt aus anderen Parapockenviren, der für PK-Protein kodiert gemäß Sequenz Protokoll ID2.

20 29. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren für Gen HD1R mit der Sequenz gemäß Sequenz Protokoll ID3.

30. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren für F9L mit der Sequenz gemäß Sequenz Protokoll ID5.

25 31. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren für den ITR-Bereich mit der Sequenz gemäß Sequenz Protokoll ID4.

32. Genprodukte hergestellt auf Basis der Sequenzen der DNA-Abschnitte gemäß 26 bis 31.

33. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß 1 bis 12, die als Insertionen Fremd-DNA enthalten, welche für immunogene Bestandteile von anderen Erregern kodieren.

34. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß 1 bis 12 und 33, die als Insertionen Fremd-DNA enthalten, welche für Immunmediatoren kodieren.

35 35. Verfahren zur Herstellung der Viren gemäß 1 bis 12, 33 und 34, dadurch gekennzeichnet, daß man die Plasmide gemäß 13 bis 25 in an sich bekannter Weise mit Parapockenviren in Zellen rekombiniert und auf die gewünschten Viren selektiert.

36. Verfahren zur Herstellung der Plasmide gemäß 22, dadurch gekennzeichnet, daß man

37. Verfahren zur Herstellung der Plasmide gemäß 13 bis 21 und 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man

40 1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,

2. sein Genom reinigt,

3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,

4. die erhaltenen Fragmente in Plasmide inseriert und

5. auf die Plasmide hin selektiert, die das Gen, das für das 10 KDa-Protein kodiert, enthalten, und

6. gegebenenfalls Insertionen und/oder Deletionen in das Gen kodierend für das 10 KDa-Protein einfügt.

45 37. Verfahren zur Herstellung der Plasmide gemäß 13 bis 21 und 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man

1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,

2. sein Genom reinigt,

3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,

4. die erhaltenen Fragmente in Plasmide inseriert und

5. auf die Plasmide hin selektiert, die das Hind III-Fragment I oder diesem entsprechende Fragmente oder Bestandteile davon enthalten,

6. und gegebenenfalls Insertionen und/oder Deletionen in diese Fragmente in den erhaltenen Plasmiden einführt.

55 38. Verfahren zur Herstellung des Hind III-Fragment I oder des DNA-Abschnittes, das für das 10 KDa-Protein kodiert, von D1701 oder des diesem Fragment oder Abschnitt entsprechenden Bereiches aus anderen Parapockenviren oder von Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man

60 1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,

2. sein Genom reinigt,

3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,

4. und die gewünschten Fragmente oder Abschnitte selektiert oder

5. gegebenenfalls die erhaltenen Fragmente des Genoms zunächst in Plasmide insertiert, die Plasmide mit den gewünschten Fragmenten isoliert, diese Plasmide vermehrt und daraus die gewünschten Fragmente isoliert.

65 39. Verfahren zur Herstellung der Genprodukte gemäß 32, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß 38 erhältlichen Fragmente in geeignete Expressionssysteme überführt und mittels dieser Systeme die Gene

exprimiert werden.

40. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren gemäß 1 bis 12 in Impfstoffen.

41. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren gemäß 1 bis 12 in Produkten, die sowohl immunisieren als auch die nicht-erregerspezifische Immunabwehr stimulieren.

42. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren in Immunmodulatoren, die die nicht-erregerspezifische Immunabwehr stimulieren. 5

43. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren für die heterologe Expression von Fremd-DNA.

44. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren als Vektoren für Fremd-DNA.

45. Verwendung der Plasmide gemäß 13 bis 25 zur Expression parapockenspezifischer Genomabschnitte. 10

46. Verwendung der Plasmide gemäß 13 bis 25 zur Herstellung von diagnostischen Mitteln.

47. Verwendung der Genomfragmente gemäß 26 bis 31 zur Herstellung von diagnostischen Mitteln.

48. DNA-Abschnitt gemäß Sequenz Protokoll ID6 (Promotor des VEGF-Gens).

49. Verwendung des DNA-Abschnitts gemäß 48 als Promotor für die Expression von DNA mit Parapockenviren. 15

Die vorstehend beschriebenen Genomfragmente von Parapockenviren, die in Plasmiden oder Viren inseriert sein können oder die als freie DNA-Abschnitte vorliegen können, umfassen die angegebenen DNA-Sequenzen und deren Varianten und Homologe.

Die vorstehend aufgeführten Begriffe haben folgende Bedeutung: 20

- Attenuierung ist ein Prozeß, bei dem die Parapockenviren durch Veränderung in ihrem Genom vermindert oder nicht-pathogen bzw. -virulent für Tiere oder Menschen geworden sind.
- Deletionen sind fehlende DNA-Teilstücke aus dem Genom von Parapockenviren. 25
- Deletionsplasmide sind Plasmide, die neben der Plasmid-DNA Parapockenvirus-Genomabschnitte tragen, denen Teilstücke entfernt wurden.
- Zur Virusvermehrung notwendige (essentielle) Genomabschnitte sind Teile des Gesamt-Genoms von Parapockenviren, die zur Vermehrung von Parapockenviren, d. h. zur Bildung von infektiösen Virusnachkommen unverzichtbar sind. 30
- Zur Virusvermehrung nicht-notwendige (nicht-essentielle) Genomabschnitte sind Teile des Gesamt-Genoms von Parapockenviren, die zur Vermehrung von Parapockenviren, d. h. zur Bildung von infektiösen Virusnachkommen, verzichtbar sind. 35
- Fremde DNA-Elemente (Fremd-DNA) sind DNA-Teilstücke, z. B. Fremd-Gene oder Nukleotidsequenzen, die in dem erfindungsgemäß eingesetzten Parapockenvirus ursprünglich nicht vorhanden sind.

Fremd-DNA wird aus folgenden Gründen in das Parapockenvirus inseriert: 40

1. zur Expression der Fremd-DNA
2. zur Inaktivierung von Funktionen von DNA-Teilstücken des Parapockenvirus
3. zur Markierung des Parapockenvirus.

In Abhängigkeit von diesen Gründen wird unterschiedliche Fremd-DNA inseriert. Soll gemäß (1) Fremd-DNA exprimiert werden, so wird die inserierte Fremd-DNA mindestens einen offenen Leserahmen tragen, der für ein oder mehrere gewünschte Fremdprotein(e) kodiert. Gegebenenfalls enthält die Fremd-DNA zusätzlich eigene oder fremde Regulatorsequenzen. Die Länge der inserierten Fremd-DNA richtet sich danach, daß die gewünschte Funktion des exprimierten Proteins gewährleistet ist. Im allgemeinen ist die Länge zwischen 1-Nukleotid und 20 kbp, bevorzugt zwischen 0,5 und 15 kbp. 45

Als Beispiele seien genannt, Gene für Immunogene von Viren, wie beispielsweise

Herpesvirus suis 1

Equine Herpesvirus 1 bis 4

Bovines Herpesvirus 1 bis 5

Maul- und Klauenseuche-Virus, Virus der Klassischen Schweinepest

50

Bovines Respiratorisches Syncytial Virus

55

Parainfluenzavirus 3 des Rindes

Bovines Virus Diarrhoe Virus

Influenzavirus

60

oder von Bakterien, wie beispielsweise

Pasteurella spec.

Salmonella spec.

Actinobacillus spec.

Chlamydia spec.

oder von Parasiten, wie beispielsweise

Toxoplasma

Dirofilaria

Echinococcus.

65

Soll gemäß (2) Fremd-DNA inseriert werden, reicht für die Unterbrechung der Vektor-Virus-DNA-Sequenz prinzipiell die Inserierung eines geeigneten Fremdnukleotids. Die maximale Länge der zur Inaktivierung inserierten Fremd-DNA richtet sich nach der Aufnahmekapazität des Vektor-Virus für Fremd-DNA. Im allgemeinen ist die Länge der Fremd-DNA zwischen 1 Nukleotid und 20 kbp, bevorzugt zwischen 0,1 und 15 kbp.

Sollen gemäß (3) DNA-Sequenzen zur Markierung inseriert werden, richtet sich ihre Länge nach der Nachweismethode zur Identifizierung des markierten Virus. Im allgemeinen ist die Länge der Fremd-DNA zwischen 1-Nukleotid und 20 kbp, bevorzugt zwischen 20 Nukleotiden und 15 kbp.

— Genbank

ist die Gesamtheit von in vermehrungsfähigen Vektoren enthaltenen Fragmenten eines Genoms. Sie wird durch Fragmentierung des Genoms und Inserierung aller, einzelner oder eines Großteils der Fragmente in vermehrungsfähige Vektoren, wie z. B. Plasmide, erhalten.

— Genomfragment ist

ein Teilstück eines Genoms, das isoliert vorliegen oder in einen vermehrungsfähigen Vektor inseriert sein kann.

— Inaktivierung durch Inserierung bedeutet,

daß die inserierte Fremd-DNA die Expression oder Funktion Parapockenvirus-eigener Genom-Sequenzen verhindert.

— Insertionen sind

DNA-Teilstücke, die zusätzlich in das Genom von Parapockenvirus eingebaut wurden. Die Länge der DNA-Teilstücke kann je nach Grund der Insertion zwischen 1 Nukleotid und mehreren tausend Nukleotiden liegen (siehe auch Definition für "Fremd-DNA").

— Insertionsplasmide sind

Plasmide, insbesondere bakterielle Plasmide, die die zu inserierende Fremd-DNA, flankiert von DNA-Sequenzen des Parapockenvirus, beinhalten.

— (Geeignete) Insertionsstellen sind

Loci in einem Virus-Genom, die zur Aufnahme von Fremd-DNA geeignet sind.

— Klonierung heißt,

daß die genomische DNA von Parapockenviren isoliert und fragmentiert wird. Die Fragmente oder eine Auswahl der Fragmente werden in gängige DNA-Vektoren (bakterielle Plasmide oder Phagenvektoren oder eukaryontische Vektoren) inseriert.

Eine Auswahl an Methoden zur Herstellung und Klonierung von DNA-Fragmenten gibt "Molecular Cloning" 2nd edition, 1989, ed. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Die DNA-Vektoren mit den Parapockenvirus-DNA-Fragmenten als Inserts dienen z. B. der Herstellung von identischen Kopien der ursprünglich isolierten DNA-Fragmente von Parapockenviren.

— Markierung durch Inserierung bedeutet,

daß die inserierte Fremd-DNA die spätere Identifizierung des veränderten Parapockenvirus ermöglicht.

— "Offener Leserahmen" ist eine Nukleotidsequenz (open reading-frame, ORF), die nicht durch ein Stoppcodon unterbrochen ist. Gewöhnlich wird anhand der DNA- oder der RNA-Sequenz überprüft, ob ein offenes Leseraster vorliegt. Crick, F.H.C., L. Barnett, S. Brenner and R.J. Watts Tobin, 1961. "General Nature of the Genetic Code for Proteins" Nature 192: 1227 -- 1232.

— Regulatorsequenzen sind

DNA-Sequenzen, die die Expression von Genen beeinflussen. Solche sind bekannt aus "Molecular Biology of the Gene", Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A. and Weiner, A.M. 1987, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park. Bevorzugt sei genannt der VEGF-Promotor, wie er beschrieben ist in Sequenz Protokoll ID6.

— Rekombinante Pockenviren sind

Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen in ihrem Genom. Die Insertionen und Deletionen wurden hierbei über molekularbiologische Methoden hergestellt.

— Repetitive (DNA)-Sequenzen sind

Sequenzen von Nukleotid-Bausteinen, die wiederholt hintereinander oder verstreut über das Genom des Parapockenvirus vorkommen.

— Vektor-Virus ist

ein Parapockenvirus, das zur Insertion von Fremd-DNA geeignet ist und die inserierte Fremd-DNA in seinem Genom in infizierte Zellen oder Organismen transportieren kann und somit dort gegebenenfalls die Expression der Fremd-DNA ermöglicht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Parapockenviren gemäß 1 bis 12 (oben) erfolgt wie folgt beschrieben:

1. Auswahl eines geeigneten Parapockenvirus-Stammes

2. Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen in dem Genom des Parapockenvirus

2a Identifizierung von Parapockenvirus-Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Genen, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung sind,

2b Identifizierung von Parapockenvirus Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Genen, die essentiell für die Virusvermehrung sind,

2c Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Bereichen außerhalb von Genen in dem Genom des Parapockenvirus und/oder in Genduplikationen

2.d Weitere Methoden zur Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen

2.e Anforderungen an eine Insertionsstelle	
2.1 Identifizierung von Insertionsstellen	
2.1.1 Reinigung des Genoms von Parapockenviren	
2.1.2 Klonierung der Genomfragmente, Etablierung einer Genbank	
2.1.3 Sequenzierung zur Identifizierung von Genen oder Genomabschnitten außerhalb von Genen	5
2.1.4 Auswahl der Klone mit Parapockenvirus-Genomfragmenten zur Weiterverarbeitung	
2.2 ITR-Region, VEGF-, PK-Gen, Genkodierend für das 10 KDa-Protein und der Bereich zwischen dem PK- und dem HDI-Gen als Insertionsstellen	
2.2.1 Klonierung des VEGF-Gens	
2.2.2 Klonierung des Proteinkinase-Gens	10
2.2.3 Klonierung des Bereichs mit dem Gen, das für das 10 KDa-Protein kodiert	
2.2.4 Klonierung des Inverted-Terminal-Repeat-Bereiches bzw. des Genomabschnittes, der zwischen dem PK-Gen und dem HDI-Gen liegt	
3. Konstruktion von Insertionsplasmiden oder von Deletionsplasmiden, die die zu inserierende Fremd-DNA enthalten,	15
3.1 Identifizierung oder Herstellung von nur einmal vorkommenden, d. h. singulären Restriktionsenzymerkennungsstellen ("unique restriction sites") in den klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA	
3.2 Deletion von Genomsequenzen in den klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA	
3.3 Eine Kombination von # 3.1 und # 3.2	20
4. Konstruktion eines rekombinanten Parapockenvirus gemäß 1 bis 12 (oben).	

1. Auswahl eines geeigneten Parapockenvirus-Stammes

Grundsätzlich sind alle Parapockenvirus-Typen oder -Stämme für die Durchführung der vorliegenden Erfahrung geeignet. Bevorzugte Stämme sind solche, die sich zu Titern $> 10^5$ PFU (Plaque Forming Unit)/ml in einer Gewebekultur vermehren lassen und aus dem Medium der infizierten Zellen als extrazelluläres, infektiöses Virus rein darstellen lassen. Bevorzugt genannt sei vom Genus der Parapockenviren die Spezies Orfvirus. 25

Als besonders bevorzugt genannt sei der Parapockenvirus-Stamm D1701, hinterlegt nach dem Budapest-Vertrag am 28.04.1988 bei Institut Pasteur, C.N.C.M. unter der Reg.Nr. CNC'M I-751, sowie seine Varianten und Mutanten. 30

Die Vermehrung der Viren erfolgt in üblicher Weise in Gewebekulturen animaler Zellen wie Säugetierzellen, z. B. in Schaf-Zellen, Rinder-Zellen, bevorzugt in Rinder-Zellen wie der permanenten Rindernieren-Zelle BK-Kl-3A (oder deren Abkömmlingen) oder Affen-Zellen wie den permanenten Affennieren-Zellen MA104 oder Vero (oder deren Abkömmlingen). 35

Die Vermehrung erfolgt in an sich bekannter Weise in stationären, Roller- oder Carrier-Kulturen in Form von geschlossenen Zellverbänden oder in Suspensionskulturen. Als Vermehrungsmedien für die Zellen werden eingesetzt alle an sich bekannten Zellkulturmedien z. B. beschrieben im Produktkatalog der Fa. Flow Laboratories GmbH Postfach 1249, Meckenheim, Deutschland, wie insbesondere das Minimal Essential Medium (MEM), das als wesentliche Bestandteile Aminosäuren, Vitamine, Salze und Kohlenhydrate enthält, komplettiert mit Puffersubstanzen wie z. B. Natrium-Bicarbonat oder Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (Hepes) und gegebenenfalls Tierseren, wie z. B. Seren von Rindern, Pferden bzw. deren Foeten. Besonders bevorzugt wird der Einsatz von foetalem Kälberserum oder Serumersatz BMS in einer Konzentration von 1–30 Vol.-%, vorzugsweise 2–10 Vol.-%. 40

Die zur Vermehrung der Viren dienenden Zellen und Zellrasen werden in üblicher Weise nahezu bis zur Konfluenz oder bis zu optimalen Zelldichte vermehrt. Vor ihrer Infektion mit Viren wird bevorzugt das Zellvermehrungsmedium entfernt und die Zellen bevorzugt mit Virusvermehrungsmedium gewaschen. Als Virusvermehrungsmedien werden eingesetzt, alle an sich bekannten Zellkulturmedien, wie insbesondere das oben genannte MEM. Danach wird mit einer Virussuspension infiziert. In der Virussuspension liegt das Virus im Virusvermehrungsmedium derart verdünnt vor, daß mit einer MOI (= multiplicity of infection, entspricht infektiöse Viruspartikel pro Zelle) von 0,01–50, bevorzugt 0,10–10 infiziert wird. 45

Die Vermehrung der Viren erfolgt mit oder ohne Zusatz von Tierseren. Für den Fall, daß Serum eingesetzt wird, wird dieses zum Vermehrungsmedium in einer Konzentration von 1–30 Vol.-%, vorzugsweise 1–10 Vol.-% zugegeben. 50

Infektion und Virusvermehrung erfolgt bei Temperaturen zwischen Raumtemperatur und 40°C, bevorzugt zwischen 32 und 39°C, besonders bevorzugt bei 37°C über mehrere Tage, bevorzugt bis zur vollständigen Zerstörung der infizierten Zellen. Bei der Virusernte kann noch zellgebundenes Virus mechanisch oder durch Ultraschall zusätzlich freigesetzt werden. 55

Das virushaltige Medium der infizierten Zellen kann dann weiter aufgearbeitet werden, z. B. durch Entfernung der Zelltrümmer mittels Filtration mit Porengrößen von z. B. 0,2–0,45 µm und/oder niedertourige Zentrifugation. 60

Filtrat oder Zentrifugationsüberstand können zur Virusreicherung und -reinigung verwendet werden. Dazu werden Filtrat oder Überstand einer hochtourigen Zentrifugation bis zur Sedimentation der Viruspartikel unterworfen. Gegebenenfalls können weitere Reinigungsschritte durch z. B. Zentrifugation in einem Dichtegradienten angeschlossen werden. 65

2. Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen auf dem Genom des Parapockenvirus

Verschiedene Bereiche des Genoms des Parapockenvirus können als Insertionstellen zur Insertion von Fremd-DNA dienen. Fremd-DNA kann inseriert werden,

5 a. in Gene, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung in vitro und/oder in vivo sind,
b. in Gene, die essentiell für die Virusvermehrung sind und/oder
c. in Bereiche, die nicht als Gene fungieren, also außerhalb von Genen liegen und/oder in Genduplikationen.

10 2.a Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Genen, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung sind, auf dem Genom des Parapockenvirus

Definition

15 Virale Gene, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung sind, können beispielsweise durch Deletionen oder Insertionen gestört werden, ohne daß die Vermehrung des Virus dadurch blockiert wird. Sie können somit als Stellen zur Insertion von Fremd-DNA bei der Konstruktion von Vektoren dienen.

Identifizierung

20 i. Solche Gene werden beispielsweise gefunden durch vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Parapockenvirus-Stämmen. Gene, die in einem oder mehreren Stämmen eines Virus nicht vorkommen, in anderen Stämmen aber gefunden werden, sind nicht-essentiell für die Virusvermehrung.
ii. Gene, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung sind, können auch auf einem alternativen Weg identifiziert werden. Nach der Sequenzierung von Genomfragmenten von Parapockenviren, die beispielsweise als klonierte Fragmente vorliegen können, werden diese DNA-Sequenzen auf mögliche "Offene Leseraster" ("Open Reading Frames", ORF) untersucht. Findet man ein ORF, wird dessen Funktion als Gen über den Nachweis einer Transkription und/oder Translation verifiziert. Um festzustellen, ob das gefundene Gen nicht-essentiell für die Virusvermehrung ist, wird das Gen durch molekulargenetische Methoden aus dem Genom des Parapockenvirus entfernt, partiell zerstört oder durch eingeführte Mutation(en) unterbrochen, und das resultierende Virus auf Vermehrungsfähigkeit untersucht. Kann das Virus auch ohne die Existenz des manipulierten Genes replizieren, handelt es sich hierbei um ein nicht-essentielles Gen.

Beispiele für identifizierte Insertionsstellen

35 i. Als Beispiel für ein nicht-essentielles Gen von Parapockenviren sei hier das VEGF-Gen des Parapoxvirus ovis genannt. Dieses Gen kommt in den untersuchten Feldstämmen von Parapoxvirus ovis (New-Zealand-2, New-Zealand-7 und D1701) vor (Lit. #6). Einige Parapockenviren, beispielsweise Stämme des Parapoxvirus bovis 1 enthalten dieses VEGF-Gen nicht. Somit ist das VEGF-Gen für Parapockenviren nicht-essentiell für die Virusvermehrung und kann als Insertionstelle für Fremd-DNA dienen. Die Identifizierung des Bereiches mit dem VEGF-Gen auf dem Genom von Parapockenviren kann mit Hilfe der im Sequenz Protokoll ID1 gezeigten DNA-Sequenz erfolgen. Über die üblichen Methoden der Molekularbiologie kann das Gen mittels Hybridisierungsexperimenten, Genom-Sequenzanalysen und/oder Polymerase-Ketten-Reaktionen auf dem Genom eines Parapockenvirus gefunden werden.

40 ii. Als weiteres Beispiel für ein nicht-essentielles Gen von Parapockenviren sei das Gen für das 10 KDa(Kilodalton)-Protein von Parapockenviren genannt. Dieses Gen kommt in Feldstämmen von Parapoxvirus ovis (New-Zealand-2, New-Zealand-7 und D1701) vor. Das Gen für das 10 KDa Protein von Parapockenviren ist nicht-essentiell für die Virusvermehrung und kann als Insertionstelle für Fremd-DNA dienen. Die Identifizierung des Bereiches mit dem Gen für das 10 KDa-Protein auf dem Genom von Parapockenviren kann mit üblichen Methoden der Molekularbiologie wie beispielsweise mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) auf dem Genom eines Parapockenvirus gefunden werden. Lit. #8 zeigt die DNA-Sequenz des 10 KDa-Protein-Gens. Die für eine PCR einsetzbaren Primer sind beispielsweise in Lit. #8 genannt. Die DNA-Sequenz eines 10 KD-spezifischen PCR-Produktes des ORF-Stammes zeigt Sequenzprotokoll ID11.

45 Für die Insertion von Fremd-DNA kann das nicht-essentielle Gen in Teilen oder vollständig aus dem Genom des Parapockenvirus entfernt werden. Es ist aber auch möglich, die Fremd-DNA in das nicht-essentielle Gen zu inserieren, ohne daß Bereiche des Parapockenvirus-Gens entfernt werden.

50 Als Insertionsstellen können beispielsweise Restriktionsenzym-Erkennungsstellen dienen.

60 2.b Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Genen, die essentiell für die Virusvermehrung sind, auf dem Genom des Parapockenvirus

Definition

65 Eine Störung von Genen, die für die Virusvermehrung essentiell sind, führt zu einer Blockade in der Virusvermehrung. Entfernt man beispielsweise Teile eines dieser Gene oder das gesamte Gen, bricht die Virusreplikation an einer bestimmten Stelle im Vermehrungszyklus des Virus ab. Infektionen oder Behandlungen mit solchen Mutanten führen nicht zu einer Freisetzung infektiöser Nachkommen aus dem Tier. Ersetzt man Teile eines oder ein gesamtes essentielles Gene(s) durch Fremd-DNA oder inseriert Fremd-DNA in essentielle Gene, können

Vektorvakzinen konstruiert werden, die im Impfling nicht vermehrungsfähig sind und somit nicht als infektiöse Erreger ausgeschieden werden.

Prinzip der Identifizierung

i. Solche Gene werden beispielsweise gefunden durch vergleichende Untersuchungen (Genomanalysen und/oder Expressions-Studien) zwischen verschiedenen Parapoxvirus-Stämmen. Gene, die in allen Virusstämmen und -isolaten vorkommen, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auch essentiell für die PPV Vermehrung.

ii. Gene, die essentiell für die Virusvermehrung sind, werden auch auf einem alternativen Weg identifiziert. Nach der Sequenzierung von viralen Genomfragmenten, die beispielsweise als klonierte Fragmente vorliegen, werden diese DNA-Sequenzen auf mögliche "Offene Leseraster" ("Open Reading Frames", ORF) untersucht werden. Findet man ein ORF, wird dessen Funktion als Gen über den Nachweis einer Transkription und/oder Translation verifiziert werden. Um festzustellen, ob das gefundene Gen essentiell für die Virusvermehrung ist, wird das Gen durch molekulargenetische Methoden im Genom des Parapockenvirus zerstört, beispielsweise durch Entfernung von Teilen oder des gesamten Gens oder durch Insertion von Fremd-DNA, und das resultierende Virus auf Vermehrungsfähigkeit untersucht. Kann die erhaltene Virusmutante nicht replizieren, handelt es sich hierbei um ein essentielles Gen.

Beispiele für Insertionsstellen

Als Beispiel sei das PK-Gen von Parapockenviren genannt. Das PK-Gen wird spät im Vermehrungszyklus des Virus exprimiert. Die Identifizierung des PK-Gens auf dem Genom von Parapockenviren kann mit Hilfe der im Sequenz Protokoll ID2 gezeigten DNA-Sequenz erfolgen. Über die üblichen Methoden der Molekularbiologie kann der Bereich mit dem Gen beispielsweise durch Hybridisierungsexperimenten, Genom-Sequenzanalysen und/oder Polymerase-Ketten-Reaktionen auf dem Genom eines Parapockenvirus gefunden werden.

Für die Insertion von Fremd-DNA kann das essentielle Gen in Teilen oder vollständig aus dem Genom des Parapockenvirus entfernt werden. Es ist aber auch möglich, die Fremd-DNA in das essentielle Gen zu inserieren, ohne daß Bereiche aus dem Parapockenvirus-Gen entfernt werden.

2.c Identifizierung von Genomabschnitten mit Insertionsstellen in Bereichen außerhalb von Genen auf dem Genom des Parapockenvirus und/oder in Genduplikationen

Definition

Genomabschnitte, die nicht für funktionelle Genprodukte kodieren, und keine essentiellen regulatorischen Funktionen besitzen (sog. intergenische Abschnitte), sind prinzipiell als Insertionsstellen für Fremd-DNA geeignet. Besonders geeignet sind Bereiche mit repetitiven Sequenzen, da Veränderungen in Teilbereichen durch verbleibende Sequenzrepetitionen kompensiert werden können. Hierunter fallen auch Gene, die in zwei- oder mehrfacher Kopie vorkommen, sogenannte Genduplikationen.

Gene in der ITR-Region oder in duplizierten Abschnitten des PPV-Genoms existieren in zwei Kopien im Virusgenom, sind also diploid. Nach Entfernen oder Schädigung einer Kopie eines solchen Gens und Insertion von Fremd-DNA können stabile PPV Rekombinanten erhalten werden, auch wenn das geschädigte Gen für die Virusvermehrung wichtig sein sollte. Eine zweite, ungeschädigte Genkopie könnte für die Genfunktionalität ausreichen.

Identifizierung

i. Die Identifizierung von Genomsequenzen, die nicht für Genprodukte kodieren, erfolgt über Sequenzanalysen des Genoms der Parapockenviren. Genombereiche in denen bei solchen Sequenzanalysen beispielsweise weder ein ORF noch virusspezifische Transkription gefunden wird und es auch keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion gibt, stellen potentielle Insertionsstellen dar. Besonders die Restriktionsenzymmerkennungsstellen in diesen Bereichen repräsentieren potentielle Insertionsstellen. Zur Überprüfung, ob eine geeignete Insertionsstelle vorliegt, wird über bekannte molekularbiologische Methoden Fremd-DNA in die potentielle Insertionsstelle inseriert werden und die resultierende Virusmutante auf Lebensfähigkeit untersucht werden. Wenn die Virusmutante, die in der möglichen Insertionstelle Fremd-DNA trägt, vermehrungsfähig ist, handelt es sich bei der untersuchten Stelle um eine geeignete Insertionstelle.

ii. Die Identifizierung von repetitiven Sequenzen sowie Genduplikationen erfolgt beispielsweise über Genom-Hybridisierungsexperimente und/oder über Sequenzanalysen erfolgen. Bei den Hybridisierungsexperimenten werden klonierte oder isolierte Genomfragmente eines Parapockenvirus (aus einer Parapockenvirus-Genbank) als Sonden für Hybridisierungen mit Restriktionsenzym-verdautem Parapockenvirus-Gesamt-Genom eingesetzt. Die Genomfragmente des Parapockenvirus, die mit mehr als einem Fragment des Gesamtgenoms des Parapockenvirus hybridisieren, enthalten eine oder mehrere repetitive Sequenzen. Um die repetitive Sequenz oder duplizierte Genombereiche auf dem Genom-Fragment genau zu lokalisieren, wird die Nukleotidsequenz bestimmt. Identische Sequenzen auf den Fragmenten sind repetitiv. Werden homologe DNA-Bereiche an zwei relativ entfernten Stellen des Genoms gefunden, handelt es sich um Genduplikation, die an eine zweite Stelle des PPV-Genoms transloziert wurde. Um festzustellen, ob eine potentielle Insertionsstelle eine geeignete Insertionsstelle im Gesamtgenom des Parapockenvirus ist, muß Fremd-DNA in eine repetitive Sequenz oder in eine Kopie der Genduplikation inseriert werden und das PPV-Genom-Fragment mit dem Insert in das Virusgenom einge-

baut werden. Anschließend wird das Fremd-DNA enthaltende rekombinante Virus auf Vermehrungsfähigkeit geprüft. Vermehrt sich das Fremd-DNA enthaltende rekombinante Virus, ist die oben identifizierte Erkennungsstelle als Insertionsstelle geeignet.

5

Beispiele für Insertionsstellen

- i. Als Beispiele für intergenische Bereiche seien genannt der Genomabschnitt zwischen dem Gen für die Proteinkinase und dem HD1R-Gen (Sequenz Protokoll ID7).
- ii. Als Beispiel für eine Wiederholungssequenz sei die ITR-Region (Inverted Terminal Repeat Region) genannt (Sequenz Protokoll ID4).
- iii. Als Beispiel diploider Gene im PPV-Stamm D1701 sei das potentielle Gen "ORF 3" (in der ITR-Region) sowie das VEGF-Gen genannt. Hybridisierungsstudien bewiesen, daß im vorliegenden Stamm D1701 ein Bereich, der das VEGF-Gen beinhaltet, dupliziert und an das andere Ende des Virusgenoms translociert wurde, so daß zwei VEGF-Genkopien vorliegen.
- Anhand der Sequenzen im Sequenz Protokoll ID4 (ITR-Sequenz mit Gen "ORF3") und ID7 (Bereich zwischen PK- und HD1R-Gen) können die entsprechenden Genombereiche bei anderen Parapockenviren über die üblichen Methoden der Molekularbiologie mittels beispielsweise Hybridisierungsexperimenten, Genom-Sequenzanalysen und/oder Polymerase-Ketten-Reaktionen gefunden werden.

20

2.d Weitere Methoden zur Identifizierung von Insertionsstellen

Generell werden mögliche Insertionsstellen auf dem Genom von Parapockenviren auch über Modifikationen der viralen Genomsequenzen gefunden. Genomstellen, an denen Nukleotid-Austausche, Deletionen und/oder Insertionen oder Kombinationen hieraus, die Virusvermehrung nicht blockieren, stellen mögliche Insertionsstellen dar. Zur Überprüfung, ob eine potentielle Insertionsstelle eine geeignete Insertionsstelle darstellt, wird über bekannte molekularbiologische Methoden Fremd-DNA in die potentielle Insertionsstelle inseriert und die resultierende Virusmutante auf Lebensfähigkeit untersucht. Wenn die Virusrekonbinante vermehrungsfähig ist, handelt es sich bei der untersuchten Stelle um eine geeignete Insertionstelle.

30

2.e Anforderungen an die Insertionsstellen

Die Insertionsstellen müssen zur Aufnahme von Fremd-DNA-Sequenzen in einer Länge geeignet sein, die sich nach ihren oben genannten Aufgaben richtet.
Bevorzugt sind Insertionsstellen, in die Fremd-DNA einer Länge von 1 Nukleotid bis zu 15 kbp inseriert werden kann.
Die Kapazität zur Aufnahme von Fremd-DNA kann durch Setzen von Deletionen im Genom des Virus vergrößert werden. Die Deletionen bewegen sich in einer Größe von 1 Nukleotid bis 20 kbp, bevorzugt von 1–10 kB.

40

2.1 Identifizierung von Insertionsstellen

2.1.1 Reinigung des Genoms von Parapockenviren

Für die molekulargenetische Klonierung von Insertionsstellen von Parapockenviren wird zunächst das Genom der Parapockenviren gereinigt. Ausgehend von dem gemäß 1 (oben) hergestellten Virus wird das Genom isoliert und gereinigt. Die Extraktion von nativer viraler DNA erfolgt bevorzugt über die Behandlung der gereinigten Virionen mit wässrigen Lösungen von Detergentien und Proteasen.

Als Detergentien seien genannt anionische, kationische, amphotere, nicht-ionische Detergentien. Bevorzugt werden ionische Detergentien eingesetzt. Besonders bevorzugt werden Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat.

Als Proteasen seien genannt alle Proteasen, die in Gegenwart von Detergents arbeiten, wie z. B. Proteinase K und Pronase. Bevorzugt sei genannt Proteinase K.

Detergentien werden in Konzentrationen von 0,1–10 Vol.-% eingesetzt, bevorzugt sind 0,5–3 Vol.-%.

Proteasen werden in Konzentrationen von 0,01–10 mg/ml Viruslysat eingesetzt, bevorzugt sind 0,05–0,5 mg/ml Viruslysat.

Es wird bevorzugt in wässriger gepufferter Lösung in Gegenwart von DNase-Inhibitoren gearbeitet. Als Puffersubstanzen seien genannt: Salze schwacher Säuren mit starken Basen wie z. B. Tris(hydroxymethylaminomethan), Salze starker Säuren mit schwachen Basen wie z. B. primäre Phosphate oder Gemische derselben.

Bevorzugt sei das folgende Puffersystem genannt: Tris(hydroxymethylaminomethan).

Die Puffersubstanzen oder Puffersysteme werden in Konzentrationen eingesetzt, die pH-Werte gewährleisten, bei denen die DNA nicht denaturiert. Bevorzugt sind pH-Werte von 5–9, besonders bevorzugt 6–8,5, ganz besonders bevorzugt 7–8, insbesondere sei Arbeiten im neutralen Bereich genannt.

DNase-Inhibitoren sind z. B. Ethyldiamintetraessigsäure in Konzentrationen von 0,1–10 Mmol, bevorzugt ist ca. 1 Mmolar.

Anschließend werden die lipophilen Bestandteile des Viruslysats extrahiert. Als Extraktionsmittel dienen Lösungsmittel wie Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol oder deren Gemische. Bevorzugt wird zunächst ein Gemisch aus Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol eingesetzt, wobei die Extraktion in einer oder mehreren

Stufen erfolgt.

In der letzten Stufe der Extraktion wird bevorzugt Chloroform/Isoamylalkohol eingesetzt. Alternativ kann zunächst Phenol und anschließend Chloroform/Isoamylalkohol eingesetzt werden.

Weitere Methoden zur Isolierung der Virus-DNA sind z. B. Zentrifugation eines Viruslysats in einem CsCl-Dichtegradienten oder in der Gelelektrophorese (Sharp et al. Biochem. 1973 (12) S. 3055–3063). 5

Die Extraktion von Nukleinsäuren wird in "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, 2nd Edition 1989, ed. J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press beschrieben.

Die so extrahierte DNA wird bevorzugt aus der wäßrigen Lösung mit z. B. Alkohol, bevorzugt mit Ethanol oder Isopropanol und unter Zusatz von monovalenten Salzen wie z. B. Alkalichloride oder -acetate, bevorzugt Lithiumchlorid, Natriumchlorid oder Natriumacetat, Kaliumacetat, ausgefällt. 10

Die Konzentration an Alkohol liegt hierbei zwischen 40 und 100 Vol.-%, bevorzugt zwischen 60 und 80 Vol.-%, besonders bevorzugt bei ca. 70 Vol.-%.

Die Chlorid- oder Acetatkonzentration liegt zwischen 0,01 und 1 molar, bevorzugt zwischen 0,1 und 0,8 molar. Wird LiCl eingesetzt, liegt seine Konzentration zwischen 0,1 und 1 molar, bevorzugt zwischen 0,4 und 0,8 molar. 15

Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren sind in "Molecular Cloning" loc. cit. ausführlich beschrieben. Die präzipitierte DNA wird durch z. B. Zentrifugation aus der wäßrigen Suspension isoliert, vorzugsweise mit Alkohol, z. B. 70 Vol.-% Ethanol, gewaschen und schließlich in wäßriger Pufferlösung resolubilisiert.

Als Puffersubstanz sei genannt Tris(hydroxymethylaminomethan) in Konzentrationen von 1–100 mM, bevorzugt wird 10–50 mM. Bevorzugte pH-Werte sind 6–8,5, besonders bevorzugt 7–8. 20

Als weitere Zusätze seien genannt z. B. EDTA (Ethylendiaminetetraessigsäure) in Konzentrationen von 0,1–10 mM, bevorzugt 1–10 mM.

Alternativ kann die präzipitierte DNA auch in 0,01 oder 0,1 × SSC-Puffer (Molecular Cloning) loc. cit. oder im Ammoniumcarbonatpuffer resolubilisiert werden. 25

2.1.2 Klonierung der Genomfragmente, Etablierung einer Genbank

25

Die so gereinigte virale DNA wird mit Restriktionsendonuklease nach Vorschrift der Hersteller behandelt. Geeignete Restriktionsendonukleasen sind solche, die mindestens eine für sie spezifische Schnittstelle auf dem Virusgenom erkennen. Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) sind z. B. EcoRI, BamHI, Sall, HindIII, PstI, XbaI, AflIII oder BspMII. Die resultierenden DNA-Fragmente können nach den bei "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, 2nd Edition 1989, ed. J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press beschriebenen Methoden in die korrespondierenden Erkennungssequenzen von bakteriellen Plasmid-Vektoren, Phagen oder Cosmiden molekular kloniert werden. Besonders bevorzugt werden für niedermolekulare DNA-Fragmente (bis ca. 15 kbp) Plasmid-Vektoren, für DNA-Fragmente ab ca. 15 kbp bis zu ca. 45 kbp Cosmide. 30

30

35

2.1.3 Sequenzierung zur Identifizierung von Genen oder Genomabschnitten außerhalb von Genen

Die Nukleotid-Sequenzen der oben hergestellten, klonierten Virus-DNA-Fragmente bzw. deren Subklone werden nach den gängigen Methoden, wie sie zum Beispiel in virologische Arbeitsmethoden, Band III: Biochemische und biophysikalische Methoden, Dernick et al., 1989, VEB Gustav Fischer Verlag beschrieben sind, bestimmt. Aus den ermittelten Nukleotidsequenzen lassen sich dann "Offene Leseraster" (Open Reading Frames, ORFs) bestimmen, die mögliche Gene signalisieren. Die Existenz der Gene lässt sich dann über Transkription bzw. Translation mit molekularbiologischen Methoden verifizieren. Um festzustellen, ob das gefundene Gen nicht-essentiell für die Virusvermehrung ist, kann das Gen durch molekulargenetische Methoden zerstört werden, indem man es beispielsweise in Teilen oder ganz aus dem PPV-Genom entfernt und das resultierende Virus auf Vermehrungsfähigkeit untersucht werden. Kann das Virus auch ohne die Existenz des entfernten Genes replizieren, handelt es sich hierbei um ein nicht-essentielles Gen. 40

40

45

Die Sequenzierung erlaubt auch die Identifizierung von Wiederholungssequenzen, sogenannten repetitiven Sequenzen. 50

Für die weitere Identifizierung sind Klone mit Fragmenten des Parapockenvirus-Genoms interessant, die Gene, Teile von Genen oder Bereiche außerhalb von Genen, beispielsweise repetitive Sequenzen und/oder Genduplikationen enthalten.

2.1.4 Auswahl der Klone mit Parapockenvirus-Genomfragmenten zur Weiterverarbeitung

55

Welche der oben erhaltenen Klone mit Genomfragmenten des Parapockenvirus weiterverarbeitet werden, hängt davon ab, ob die herzustellenden rekombinanten Parapockenviren (i) replikationsfähig oder (ii) replikationsdefekt sein sollen.

60

i. Sollen rekombinante Parapockenviren hergestellt werden, die trotz der Insertion und/oder Deletion die Fähigkeit zur Bildung von infektiösen Nachkommen nicht verloren haben, also replikationsfähig sind, werden klonierte virale Genomfragmente weiterverarbeitet, die Gene oder Genombereiche außerhalb von Genen enthalten, die nicht-essentiell für die Virusvermehrung sind oder Genduplikationen enthalten.

65

Die Prüfung, ob es sich bei dem vorliegenden Gen oder Genombereich um eine nicht-essentielle Region des Virusgenoms handelt oder um eine Genduplikation handelt, die aufgrund der Kompensation durch das identische Gen, zerstört wird, kann über Virusmutanten bestimmt werden. Hierzu wird das untersuchte Gen bzw. der untersuchte Genombereich im Parapockenvirus durch molekularbiologische Methoden inaktiviert, beispielsweise durch teilweise oder vollständige Deletion des fraglichen Bereiches, und die Vermehrungsfähigkeit der

65

Virusmutante untersucht. Kann die Virusmutante sich trotz der Inaktivierung des fraglichen Gens oder Genombereiches vermehren, handelt es sich bei dem untersuchten Gen oder Genombereich um eine nicht-essentielle Region.

5 Bevorzugt werden klonierte Genomfragmente des Parapockenvirus, die die nicht-essentiellen Gene intakt, d. h. vollständig enthalten. Darüber hinaus sollten an beiden Enden der Gene oder der Genombereiche die flankierenden viralen Genombereiche ebenfalls enthalten sein. Die Länge der flankierenden Bereiche sollte mehr als 100 Basenpaare betragen. Liegen solche Genomklone nicht vor, können sie aus bestehenden Genomklonen mit molekularbiologischen Methoden hergestellt werden. Enthalten die klonierten Genomfragmente zusätzliche Genombereiche, die für die vorliegende Herstellung nicht benötigt werden, können diese durch weitere Klonierungen entfernt werden.

10 ii Sollen rekombinante Parapockenviren hergestellt werden, die aufgrund der Insertion und/oder Deletion die Fähigkeit zur Bildung von infektiösen Nachkommen verloren haben, also replikationsdefekt sind, werden klonierte virale Genomfragmente weiterverarbeitet, die Gene oder Genombereiche außerhalb von Genen enthalten, die essentiell für die Virusvermehrung sind.

15 Die Prüfung, ob es sich bei dem vorliegenden Gen oder Genombereich um eine essentielle Region des Virusgenoms handelt, kann über Virusmutanten bestimmt werden. Hierzu wird das untersuchte Gen bzw. der untersuchte Genombereich im Parapockenvirus durch molekularbiologische Methoden inaktiviert, beispielsweise durch teilweise oder vollständige Deletion des fraglichen Bereiches, und die Vermehrungsfähigkeit der Virusmutante untersucht. Kann die Virusmutante sich aufgrund der Inaktivierung des fraglichen Gens oder Genombereiches nicht mehr vermehren, handelt es sich bei dem untersuchten Gen oder Genombereich um eine essentielle Region.

20 25 Bevorzugt werden klonierte Genomfragmente des Parapockenvirus, die die essentiellen Gene intakt, d. h. vollständig enthalten. Darüber hinaus sollten an beiden Enden der Gene oder der Genombereiche die flankierenden viralen Genombereiche ebenfalls enthalten sein. Die Länge der flankierenden Bereiche sollte mehr als 100 Basenpaare betragen. Liegen solche Genomklone nicht vor, können sie aus bestehenden Genomklonen mit molekularbiologischen Methoden hergestellt werden. Enthalten die klonierten Genomfragmente zusätzliche Genombereiche, die für die vorliegende Herstellung nicht benötigt werden, können diese durch weitere Klonierungen entfernt werden.

30 2.2 ITR-Region, VEGF-Gen, PK-Gen, Gen kodierend für das 10 KDa-Protein und der Bereich zwischen dem PK-Gen und dem HDI-Gen als Insertionsstelle

35 Soll die ITR-Region, das VEGF-Gen, das PK-Gen, das Gen, das für 10 KDa-Protein kodiert oder der intergenische Bereich zwischen dem PK-Gen und dem HDI-Gen als Insertionsstelle in einem Parapockenvirus benutzt werden, müssen die entsprechenden Bereiche des Parapockenvirus-Genoms, die die Insertionsstellen beinhalten, isoliert werden. Hierzu werden bevorzugt die entsprechenden Bereiche des Parapockenvirus-Genoms kloniert.

2.2.1 Klonierung des VEGF-Gens

40 Das Gen, das für VEGF kodiert, wird auf dem Genom des Parapockenvirus lokalisiert und anschließend in Teilen oder in seiner Gesamtheit mit seinen flankierenden Genom-Abschnitten isoliert. Hierzu wird bevorzugt das Parapockenvirus gemäß 1 vermehrt und, ebenfalls bevorzugt, das Genom gemäß #2.1.1 gereinigt.

45 a. Das VEGF-Gen wird beispielsweise über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Die für diese Reaktion notwendigen Start-Sequenzen (Primer) werden aus der im Sequenz Protokoll ID1 dargestellten DNA-Sequenz des VEGF-Gens abgeleitet. Das erhaltene Amplifikat wird bevorzugt anschließend molekular kloniert.

50 b. Bevorzugt wird die Region, die das VEGF-Gen und seine flankierenden Genomabschnitte enthält, über Fragmentierung des Parapockenvirus-Genoms und Isolierung sowie Klonierung des oder der entsprechenden Genom-Fragmente gewonnen. Hierfür wird das gereinigte Genom des Virus wie in #2.1.2 beschrieben mit Restriktionsenzym, besonders bevorzugt mit dem Enzym HindIII, behandelt. Zur Identifizierung des oder der Genomfragmente, das oder die das VEGF-Gen und seine flankierenden Genomabschnitte tragen, werden bevorzugt die nach dem Enzymverdau erhaltenen Genom-Fragmente aufgetrennt.

55 Als Methoden zur Auftrennung der DNA-Fragmente kommen elektrophoretische und chromatographische Verfahren in Frage. Bei den chromatographischen Verfahren sei genannt Gelfiltration. Bei den elektrophoretischen Verfahren seien als Träger genannt Agarose oder Polyacrylamid. Als Elektrophoresepuffer seien genannt z. B. Ethyldiamintetraessigsäure Phosphat-Puffer (EPP) oder Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-borat-ethyldiamintetraessigsäure-Puffer (TBE).

60 Eine detaillierte Aufstellung und Beschreibung von Elektrophoresepuffern ist in

- Current Protocols in Molecular Biology 1987 – 1988, Verlag Wiley-Interscience, 1987
- A Practical Guide to Molecular Cloning, Perbal, 2nd edition, Verlag Wiley Interscience, 1988
- Molecular Cloning, loc. cit.
- Virologische Arbeitsmethoden, Band III, Gustav Fischer Verlag, 1989

65 beschrieben.

Die Durchführung des Verfahrens ist beispielsweise beschrieben in "Molecular Cloning" loc. cit. oder in Virolog.

Arbeitsmethoden, Band III, loc. cit.

Die Identifizierung der Genom-Fragmente, die das VEGF-Gen und seine flankierenden Sequenzen tragen, erfolgt beispielsweise durch Hybridisierung mit definierten Nukleinsäure-Sonden. Die aufgetrennten Genom-Fragmente werden hierzu auf Filter übertragen und mit VEGF-spezifischen und markierten Nukleinsäure-Sonden nach der Southern-Blot-Methode hybridisiert. Die Methode des Transfers der Genom-Fragmente und der Hybridisierung kann nach Standard-Protokollen, wie sie unter "Southern-Blotting" in Molecular cloning loc. cit. beschrieben sind, erfolgen. Die als Sonden einsetzbaren Oligo-Nukleotide oder Nukleinsäure-Fragmente lassen sich aus Sequenzprotokoll Seq ID No 1 ableiten. Beispielsweise wird das TaqI-Subfragment (366 bp), wie es aus Seq ID No 1 ersichtlich ist, als Hybridisierungssonde eingesetzt.

Die Genomfragmente, die nachgewiesenermaßen Teile oder bevorzugt das gesamte VEGF-Gen und die flankierenden Genomabschnitte enthalten, werden isoliert und kloniert. Die Isolierung des oder der entsprechenden Genom-Fragmente erfolgt beispielsweise aus dem Elektrophorese-Gel über Elektroelution aus dem entsprechenden Gelbereich. Alternativ kann beispielsweise auch mittels "Low-Melting-Agarose"-Verfahren das oder die Genomfragmente aus dem Elektrophorese-Gel nach gängigen Verfahren isoliert werden.

Zur Klonierung des VEGF-Gens werden die oben hergestellten Genom-Fragmente in bakterielle oder eukaryontische Vektoren inseriert. Besonders bevorzugt werden zunächst bakterielle Plasmid- oder Phagen-Vektoren. Zur Insertion des Genom-Fragments werden doppelsträngige Plasmid- oder Phagenvektor-DNA-Moleküle mit Restriktionsenzymen behandelt, so daß für die Inserierung geeignete Enden entstehen.

Als Plasmide dienen bekannt Plasmide, z. B. pSPT18/19, pAT153, pACYC184, pUC18/19, pBR322, pSP64/65.

Als Phagenvektoren dienen z. B. die bekannten Lambdaphagenvarianten wie z. B. -ZAP, -gt10/11 oder Phage M13mp18/19.

Die einsetzbaren Restriktionsenzyme sind an sich bekannt z. B. aus Gene Band 92 (1989) Elsevier Science Publishers BV Amsterdam.

Das mit Restriktionsenzym behandelte Plasmid oder der Phagenvektor wird mit einem Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragments z. B. etwa im Verhältnis 5 zu 1, gemischt und mit DNA-Ligasen behandelt, um das DNA-Fragment End-zu-End in den Vektor kovalent zu binden. Ligasen sind Enzyme, die in der Lage sind zwei DNA-Moleküle über 3'-OH-5'-Reste zu verbinden. Der Ligierungsansatz wird zur Vermehrung der Plasmide oder Phagen in pro- oder eukaryontischen Zellen, bevorzugt in Bakterien, eingebracht und diese vermehrt. Als Bakterien dienen z. B. Escherichia coli Stamm K-12 und seine Derivate z. B. K 12-600 (Molecular Cloning loc. cit.). Die Vorbereitung des Ligierungsansatzes und der Bakterienkultur erfolgt in an sich bekannter Weise wie in Molecular Cloning loc. cit. beschrieben. Die Bakterien, die Plasmide mit inserierter Fremd-DNA bzw. Phagen mit Fremd-DNA enthalten, werden selektiert.

Die Identität der Fremd-DNA wird bevorzugt über Hybridierungsexperimente und besonders bevorzugt über Sequenz-Analysen verifiziert. Ggf. werden Subklonierungen vorgenommen, um intakte VEGF-Gene inkl. deren flankierende Genomabschnitte als Nukleinsäure-Klone zu erhalten.

2.2.2 Klonierung des Protein-Kinase-Gens

Das Gen, das für die Protein-Kinase kodiert, wird auf dem Genom des PPV lokalisiert und anschließend in Teilen oder ganz mit seinen flankierenden Genomabschnitten isoliert.

Wie die Klonierung des VEGF-Gens ausführlich beschrieben (oben), wird das Pockenvirus bevorzugt vermehrt, sein Genom gereinigt und der Bereich auf dem Genom, der für das PK-Gen kodiert über eine Polymerase-Ketten-Reaktion und bevorzugt durch anschließende Klonierung gewonnen.

Alternativ kann dieser Bereich, wie für die Klonierung des VEGF-Gens beschrieben, über die Fragmentierung des PPV-Genoms, bevorzugt mit anschließender Klonierung der Fragmente, und Selektion der Fragmente bzw. Klone, die Teile des PK-Gens oder bevorzugt das gesamte PK-Gen mit flankierenden DNA-Sequenzen des PPV-Genoms enthalten, gewonnen werden. DNA-Moleküle, die als Primer einer PCR oder als Sonden für eine Hybridisierung eingesetzt werden können, sind in Sequenz Protokoll ID2 bzw. ID9 erkennbar.

Gegebenenfalls werden Subklonierungen vorgenommen, um intakte PK-Gene inklusive deren flankierende Genomabschnitte auf dem Genom des PPV zu erhalten.

2.2.3 Klonierung des Gens, das für das 10 KDa-Protein kodiert

Das Gen, das für das 10 KDa-Protein kodiert wird entsprechend dem Verfahren, wie es für das VEGF-Gen und das PK-Gen ausführlich beschrieben wurde (oben), auf dem Genom des PPV lokalisiert und in Teilen oder bevorzugt ganz mit seinen flankierenden PPV-Genomsequenzen isoliert.

Dabei wird der Bereich des PPV-Genoms, der das Gen für das 10 KDa-Protein oder Teile davon enthält, bevorzugt über PCR und/oder Klonierung und Identifizierung und Selektion der geeigneten Klone erhalten.

DNA-Moleküle, die als Primer einer PCR oder als Sonden für eine Hybridisierung eingesetzt werden können, können Lit. #8 entnommen werden. Gegebenenfalls werden Subklonierungen vorgenommen, um intakte Gene kodierend für das 10 KDa-Protein inklusive deren flankierende PPV-Genomabschnitte zu erhalten.

2.2.4 Klonierung des Inverted-Terminal-Repeat-Bereiches bzw. des Genomabschnittes, der zwischen dem PK-Gen und dem HDIR-Gen liegt

Die Vorgehensweise entspricht der wie für die Klonierung des VEGF-Gens ausführlich beschrieben wurde (oben). Die DNA-Moleküle, die zur Isolierung der entsprechenden Bereich als Primer einer PCR oder als Sonden für eine Hybridisierung eingesetzt werden können, sind im Sequenz Protokoll ID4 (ITR-Region) und 7

(Bereich zwischen PK-Gen und HDI-Gen) ersichtlich.

3. Konstruktion von Insertionsplasmiden, die die zu inserierende Fremd-DNA enthalten, oder von Deletionsplasmiden

5 Auf Basis der unter #2 identifizierten, lokalisierten und klonierten Genomfragmente von Parapockenviren werden sogenannte Insertionsplasmide hergestellt, die zur Insertion von Fremd-DNA in das Genom der Parapockenviren später benutzt werden können. Die Insertionsplasmide tragen dann die in das Parapockenvirus zu inserierende Fremd-DNA, flankiert von Genomabschnitten des Parapockenvirus. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die Insertionsplasmide herzustellen: Als Beispiele seien hier erwähnt:

10 3.1 Identifizierung oder Herstellung von nur einmal-vorkommenden, d. h. singulären Restriktionsenzymerkennungsstellen ("unique restriction sites") in den klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA,
15 3.2 Deletion von Genomsequenzen in den klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA
20 3.3 Eine Kombination von #3.1 und #3.2

25 3.1 Identifizierung oder Herstellung von singulären Restriktionsenzymerkennungsstellen ("unique restriction sites") in den nach 2.1.4 oder 2.2 erhaltenen klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA

30 Die beispielsweise gemäß 2.1.3 ermittelten Nukleotidsequenzen der Genomfragmente der Parapockenviren geben direkt Aufschluß über singuläre Restriktionsenzymerkennungsstellen, an denen das Fragment nach Behandlung mit dem entsprechenden Enzym an nur einer Stelle geöffnet wird. Ggf. können durch Insertion von beispielsweise synthetisch hergestellten Oligo-Nukleotiden, beispielsweise sogenannte "Polylinker", singuläre Restriktionsenzymerkennungsstellen eingebaut werden. Hierzu wird das Parapockenvirus-Genomfragment mit der Insertionsstelle mit einem Restriktionsenzym, das das Fragment nur an einer Stelle öffnet, behandelt. Das so geöffnete Fragment wird mit einem Polylinker und Ligase inkubiert, um gezielt andere Restriktionsenzymerkennungsstellen zu inserieren.

35 Polylinker sind DNA-Sequenzen, die mindestens zwei Restriktionsenzymerkennungsstellen hintereinander-
geschaltet tragen.

40 Als Ligase sei z. B. genannt T4-DNA-Ligase.

45 Die erhaltenen Plasmide werden in pro- oder eukaryontischen Zellen, Bakterien, vermehrt und selektiert.

50 Alternativ können auch nach der Methode "PCR Mutagenesis", wie sie von Jacobs et al. (Arch. Virol. 131, 251 – 264) beschrieben wurde, neue singuläre Restriktionsenzymerkennungsstellen in die Parapockenvirus-Genomfragmente eingebaut werden.

(Jacobs, L., H.-J. Rziha, T.G. Kimman, A.L.J. Gielkens und J.T. van Oirschot. 1993, Arch. Virol. 131, 251 – 264, LIT)

55 In die hier identifizierten und/oder hergestellten singulären Restriktionsenzymerkennungsstellen können nach den bekannten Methoden der Molekularbiologie die in das Parapockenvirus zu inserierende Fremd-DNA inseriert werden. Das Parapockenvirus-Genomfragment mit der Insertionsstelle wird mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen behandelt, die an der Insertionsstelle bzw. im inserierten Polylinker das Fragment auftrennen. Die Fremd-DNA wird nach den an sich bekannten Methoden beispielsweise der "sticky-end"- oder "blunt-end"-Ligation, mittels Ligasen in die Erkennungsstelle inseriert. Der Inkubationsansatz wird nach der Ligasereaktion in pro- oder eukaryontische Zellen, bevorzugt Bakterien, eingebracht und die Plasmide vermehrt und selektiert.

60 Die oben erwähnten Methoden, die zur Herstellung der Insertionsplasmide angewendet werden, sind im Detail in "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, 2nd Edition 1989, ed. J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

65 3.2 Deletion von Genomsequenzen in den klonierten Genomfragmenten und Insertion von Fremd-DNA

70 Die Deletion von Subfragmenten aus den klonierten Parapockenvirus-Genomfragmenten kann beispielsweise durch Behandlung mit Restriktionsenzymen erfolgen. In einem möglichen Ansatz werden Restriktionsenzyme bevorzugt, die mehr als eine, besonders bevorzugt 2 Erkennungsstellen in dem Genomfragment erkennen. Nach der Enzymbehandlung werden die erhaltenen Fragmente, wie oben beschrieben beispielsweise elektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und die entsprechenden Fragmente mit beispielsweise Ligase-Behandlung wieder zusammengefügt. Die erhaltenen Plasmide werden vermehrt und die deletierten Plasmide selektiert.

75 In einem alternativen Ansatz wird eine singuläre Restriktionsenzymerkennungsstelle auf dem Parapockenvirus-Genomfragment als Startpunkt für einen bidirektionalen Abbau der Fragmente mit einer Endonuklease, beispielsweise dem Enzym Bal31, genutzt. Die Reaktionsdauer bestimmt hierbei die Länge der Deletion, deren Ausmaß über kinetisch genommene Proben in der Elektrophorese verfolgt werden kann. Nach der Reaktion können die neu entstandenen Fragmentenden mit Oligonukleotiden ergänzt werden, um beispielsweise neue singuläre Restriktionsenzymerkennungsstellen einzubauen. Der Einbau von Fremd-DNA kann dann, wie oben beschrieben, erfolgen.

80 4. Konstruktion eines rekombinanten Parapockenvirus gemäß 1 bis 12

85 Insertion von Fremd-DNA in das Parapockenvirus-Genom:

DE 196 39 601 A1

Für den Einbau des fremden genetischen Elements in das Vektor-Virus werden folgende Verfahren angewandt werden:

- a. Gleichzeitige Transfektion der Insertions- oder Deletionsplasmid-DNA und Infektion mit Parapocken-Virus in geeigneten Wirtszellen, 5
- b. Transfektion der Insertions- oder Deletionsplasmid-DNA und anschließende Infektion mit dem Parapocken-Virus in geeigneten Wirtszellen,
- c. Infektion mit dem Parapocken-Virus und anschließende Transfektion mit der Insertions- oder Deletionsplasmid-DNA in geeigneten Wirtszellen. 10

Die Methoden der hier geeigneten Verfahren sind beschrieben in "Methods in Virology Vol. VI" (1977), ed. K. Maramorosch, H. Koprowski, Academic Press New York, San Francisco, London. Bevorzugt wird die Transfektion die Methode der sogenannten Calcium-Phosphat-Technik ("Methods in Virology Vol. VI" (1977), ed. K. Maramorosch, H. Koprowski, Academic Press New York, San Francisco, London).

Bevorzugt wird das Verfahren #c (oben) eingesetzt. Hierzu sind folgende Schritte notwendig: 15

1. Infektion mit Parapockenvirus:

Für die Herstellung der Parapockenviren mit Fremd-DNA werden Zellkulturen bevorzugt, die eine gute Virusvermehrung und eine effiziente Transfektion erlauben, beispielsweise die permanente Rindernierenzelle BK-KL-3A. Bevorzugt wird weiterhin ein Verfahren, bei dem die Zellen zuerst mit dem Virus infiziert und anschließend mit gereinigter Plasmid-DNA in Suspension transfiziert werden. 20

2. Herstellung der Insertions- oder Deletionsplasmid-DNA:

Die nach den vorne beschriebenen Verfahren erhaltenen transformierten Zellen, beispielsweise Bakterien, die Insertions- oder Deletionsplasmide enthalten, werden vermehrt und die Plasmide in an sich bekannter Weise aus den Zellen isoliert und weiter gereinigt. Die Reinigung erfolgt z. B. durch eine isopyknische Zentrifugation im Dichtegradienten von z. B. CsCl oder durch Affinitätsreinigung an kommerziell erhältlichen Silikatpartikeln (z. B. Qiagen). 25

3. Transfektion:

Zur Transfektion wird die Plasmid-DNA zirkular oder linearisiert eingesetzt.

4. Zellkultivierung:

Die Zellen werden nach den vorne (Auswahl eines geeigneten Parapockenvirus-Stammes) beschriebenen Methoden kultiviert. Beim Auftreten eines zytopathogenen Effektes wird das Kulturmedium entfernt, gegebenenfalls durch Zentrifugation oder Filtration von Zelltrümmern befreit und gegebenenfalls gelagert sowie nach den herkömmlichen Methoden der Einzel-Plaque-Reinigung von Viren aufgearbeitet. 30

Ganz besonders bevorzugt wird folgendes Verfahren bei der Herstellung rekombinanter Parapockenviren:

1. BK-KL3A-Zellen werden gezählt und in Suspension mit plaquegereinigtem Parapoxvirus (PPV) bei einer Multiplizität der Infektion von 1 (MOI = 1) infiziert und 2 bis 4 Stunden unter leichtem Rühren bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Transfektion mit gereinigter Insertions- oder Deletions-Plasmid-DNA mit pelletierten Zellen. Parallel werden nicht infizierte Zellen in gleicher Wiese transfiziert. 40

2. Nach der Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode (Ca/P-Methode) (van der Eb, 1973) und Glycerolschock werden die infizierten und transfizierten Zellen im Verhältnis 1 : 10 mit nur transfizierten (oder unbehandelten) Zellen gemischt, um bei der Weiterkultivierung den direkten virotoxischen Effekt der Pockenviren zu vermeiden. Die Zumischung transfizierter Zellen erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß Virus bei der von Zelle zu Zelle voranschreitenden Infektion wieder auf Plasmid-DNA trifft und eine Rekombination eintreten kann. Anschließend wird das Zellgemisch in 6-Lochplatten oder anderen Kulturgefäßen stationär bei 37°C kultiviert, bis mikroskopisch eine virustypische Zellzerstörung in Form von Plaques sichtbar ist. 45

Die Selektion von rekombinanten Viren, die Fremd-DNA enthalten, erfolgt in Abhängigkeit von der inserierten Fremd-DNA z. B. durch:

- a. Expression der Fremd-DNA mit Hilfe der rekombinanten Viren,
- b. Nachweis des Vorhandenseins der Fremd-DNA, z. B. durch DNA/DNA-Hybridisierungen,
- c. Die Amplifikation der Fremd-DNA mittels der PCR. 55

zu a.

Die Expression der Fremd-DNA auf Protein-Ebene kann nachgewiesen werden durch z. B. Infektion von Zellen mit dem Virus und anschließender Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen das von der Fremd-DNA kodierte Protein oder durch Immunpräzipitation oder Western Blotting mit Antikörpern gegen das von der Fremd-DNA kodierte Protein aus den Lysaten infizierter Zellen. 60

Die Expression der Fremd-DNA auf RNA-Ebene kann nachgewiesen werden durch Hybridisierung der RNA aus mit Virus infizierten Zellen mit DNA, die zumindest in Teilen identisch sind mit der inserierten Fremd-DNA. 65

zu b.

5 Hierzu wird die DNA aus dem fraglichen Virus gewonnen und mit Nukleinsäure, die zumindest in Teilen mit der inserierten Fremd-DNA identisch ist, hybridisiert.

10 Die Einzel-Plaque-gereinigten und als Rekombinanten identifizierten Vektor-Viren werden bevorzugt nochmals auf Vorhandensein und/oder Expression der Fremd-DNA geprüft. Rekombinante Vektor-Viren, die die Fremd-DNA stabil enthalten und/oder exprimieren, stehen für die weitere Anwendung zur Verfügung.

Beispiele

15 Die vorliegende Erfindung wird besonders bevorzugt in einem Bereich des Parapoxvirus-Genoms, der sich für die Insertion und Expression homologer und heterologer Gene oder Teilen davon eignet, durchgeführt. Dieses genomische Fragment wird durch ein 5516 Basenpaar großes HindIII-DNA-Fragment des Parapoxvirus- 20 Stammes orf D1701 (und seiner jeweiligen Derivate) dargestellt (Sequenz Protokoll ID8).

1. Klonierung des HindIII-Fragments I

25 Nach Spaltung gereinigter viraler DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII wurden die resultierenden DNA-Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt, das etwa 5,6 kbp große Fragment I ausgeschnitten und durch Qiaex-Reinigung (Qiagen) isoliert. Dieses DNA-Fragment wurde mit Standardtechniken (Maniatis et al.) in das mit HindIII gespaltene und mit CIP (Kälberdarm-Phosphatase) behandelte Vektorplasmid pSPT18 (Boehringer, Mannheim) kloniert. Die resultierenden rekombinanten Plasmide pORF-1 und pORF-2 unterscheiden sich nur durch die Orientierung des Inserts. Die Anfertigung einer Restriktionskarte ermöglichte eine weitere Subklonierung, wie es in Abb. 1 gezeigt wird. Alle rekombinanten Plasmid-DNAs wurden durch Southern-Blot-Hybridisierung auf restriktionsverdaute virale oder Plasmid-DNA getestet, um ihre Identität und virale Herkunft zu überprüfen.

2. DNA-Sequenzierung

30 Die DNA-Sequenzierung wurde durch Verwendung von doppelsträngiger DNA der verschiedenen rekombinanten Plasmide und SP6- sowie T7-spezifischen Primern, die an beide Enden der Klonierungsstelle des Vektorplasmids pSPT18 binden, bewerkstelligt. Das Didesoxy-Kettenterminationsverfahren nach Sanger wurde nach den Empfehlungen des Herstellers (Pharmacia — LKB) in Gegenwart von $^{35}\text{S}-[\alpha]\text{dATP}$ und T7-DNA-Polymerase durchgeführt. Gemäß der erhaltenen DNA-Sequenz wurde eine Vielzahl von Oligonucleotiden synthetisiert und zum Sequenzieren beider Stränge des vollständigen insertierten HindIII-Fragments I verwendet. Um Sequenzierungsartefakte oder Bandenkompression aufgrund des relativ hohen G + C-Gehalts des viralen DNA- 35 Inserts (64,78%) aufzulösen, wurde 7-Desaza-GTP verwendet, und die Sequenzierungsprodukte wurden, falls notwendig, in formamidhaltigen denaturierenden Polyacrylamidgelen getrennt.

3. Identifizierung potentieller Gene

40 Eine computergestützte Analyse der erhaltenen DNA-Sequenz (5516 Nucleotide) offenbarte mehrere mögliche offene Leseraster (ORF). Die von diesem ORFs abgeleitete Aminosäuresequenz wurde für Genhomologierecherchen (LIT, GCG) verwendet. Als Ergebnis wurden signifikante Aminosäurehomologien mit den folgenden Genen nachgewiesen (siehe auch Abb. 1).

45 3.1 Ein ORF mit einer Aminosäurehomologie (36,1 bis 38,3% Identität; 52,8 58,6% Ähnlichkeit) zum vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) verschiedener Säugerspezies (z. B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, Rind, Mensch) und auch zu dem VEGF-Gen, das vor kurzem in den Parapoxvirus-Stämmen NZ-2 und NZ-7 beschrieben wurde (Lit. #6), wurde gefunden. Ein entsprechendes Genhomolog ist bei anderen Pockenviren, wie verschiedenen Orthopoxviren, nicht bekannt. Dieses ORF, das als VEGF bezeichnet wird, umfaßt 399 Nucleotide und codiert ein Polypeptid mit 132 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 14,77 kDa. Transcriptionsanalysen unter Verwendung von Northern-Blot-Hybridisierung, RNA-Protektions-Versuchen und Primerverlängerungstests mit gesamter oder Oligo (dT)-selektierter RNA, die aus infizierten Zellen isoliert wurde, belegten die Expression von VEGF als frühes Gen ab etwa 2 Stunden nach der Infektion (p.i.). Es wurde gefunden, daß die spezifische mRNA 422 bis 425 Basen abdeckt, beginnend direkt stromabwärts einer Sequenz, die 100% Homologie mit dem kritischen Bereich eines Consensusmotivs zeigt, das typisch für Promotoren früher Gene des Vaccinia-Virus ist. Das 3'-Ende der VEGF-mRNA konnte in eine Consensussequenz kartiert werden, die frühen Transkripten von z. B. Vaccinia-Virus-Genen gemeinsam ist. Durch Northern-Blotting wurde die Größe dieser mRNA auf ungefähr 500 Basen geschätzt, was auf einen Poly(A)-Abschnitt mit einer Länge von etwa 100 Basen hinweist.

50 3.2 Ein weiteres ORF wurde gefunden, das für eine potentielle Proteinkinase (PK) mit Homologie zu einem entsprechenden Gen codiert, das in mehreren Orthopoxviren (z. B. Vaccinia-, Variola- oder Shope-Fibroma-Virus) vorkommt und als F10L bekannt ist. Dieses Gen-Homolog wird im Infektionszyklus von orf D1701 spät transkribiert (ab 12 bis 16 Stunden p.i.). Der Transcriptionsstartpunkt befindet sich kurz stromabwärts eines Bereichs, der eine gute Homologie zu bekannten Promotoren später Gene des Vaccinia-Virus zeigt.

55 3.3 Weitere mögliche ORFs wurden gefunden, die keine auffälligen Homologien zu irgendeiner bekannten

Gensequenz zeigen. Von besonderem Interesse könnte ein potentielles Gen sein, das als Gen HDIR bezeichnet wird (Abb. 1). Analysen wie die oben beschriebenen zeigten die Transkription einer spezifischen frühen mRNA mit einer Größe von 1,6 kb.

3.4 Schließlich wurde mittels Computer ein ORF gefunden, das das 3'-Ende von F10L und das 5'-Ende von VEGF überlappt (F9L, Abb. 1). Ein Vergleich mit beschriebenen Genen zeigte eine geringe, über diesen ORF verteilte (dispergierte) Homologie mit dem F9L-Gen des Vaccinia-Virus. 5

3.5 Verglichen zu bekannten DNA Sequenzen der Orf Stämme NZ2 und NZ7 ließ sich der Beginn der sogenannten ITR Region im Genom von D1701 bei Nukleotidposition 1611 des HindIII-Fragments I festlegen. Bei der ITR Region handelt es sich um einen am Ende des Pockenvirusgenoms auftretenden Sequenzbereich, der am anderen Genomende in umgekehrter Orientierung ebenfalls vorliegt und daher als "inverted repeat region" (ITR) bezeichnet wird. Der Befund des Sequenzvergleichs deckt sich mit Versuchen zur Genomlokalisierung des in pORF-1 klonierten HindIII-Fragments I von D1701. Die Kartierung dieses Fragments und des vermutlich identischen HindIII-Fragments H ist in Abb. 2 dargestellt. Hieraus läßt sich schließen, daß die ITR des D1701 Genoms ca. 2,6 kbp umfaßt. 10

Versuche zur Bestimmung des 3'-Endes der VEGF mRNA von D1701 enthielten, daß zwischen ca. 40 und 220 bp nach dem Übergang zur ITR in der ITR mindestens eine weitere virusspezifische RNA startet. Das entsprechende Gen wurde aufgrund der Aminosäurehomologie zu NZ2 als ORF3 bezeichnet (Abb. 1). Vor dem putativen 5'-Ende der ORF3-mRNA befindet sich eine Konsensussequenz, die typisch für einen frühen Promotor von Pockenviren ist. Homologie zu anderen bekannten Genen konnte bisher nicht gefunden werden. 15

20

4. Einführung von DNA-Sequenzen in das HindIII-Fragment I

Die Möglichkeit der Verwendung des beschriebenen HindIII-DNA-Fragments (in den Plasmiden pORF-1 und pORF-2 kloniert) für die Einführung homologer oder heterologer DNA-Sequenzen wurde erarbeitet. Im folgenden wurden drei verschiedene Strategien angewandt, um dieses Ziel zu erreichen. 25

25

4.1 Insertion in intergenische, nichtcodierende Bereiche

Identifizierung oder Schaffung neuer singulärer Restriktionsstellen, die sie in einem intergenischen, nichtcodierenden Teil befinden. Diese Stellen werden dann verwendet, um fremde DNA-Sequenzen zu inserieren, die funktionelle und nachweisbare Genprodukte (z. B. das lacZ-Gens, von *E. coli*) oder Teile davon codieren. Für die folgenden Beispiele wurde das Plasmid pGSRZ konstruiert, das das funktionelle lacZ-Gen von *E. coli* unter der Kontrolle des 11K-Promotors des Vaccinia-Virus enthält. Zu diesem Zweck wurden die relevanten DNA-Teile des Plasmids pUCIILZ (Sutter et al., 1992) isoliert und in das Plasmid pSPT18 einkloniert. Diese funktionelle 11K-lacZ-Genkombination (im folgenden als lacZ-Cassette bezeichnet) kann durch Isolierung eines 3,2-kbp großen SmaI-Sall-Fragments von pGSRZ erhalten werden (Abb. 3). 30

30

35

Beispiel 4.1.1

Das Plasmid pORF-PB (Abb. 1) enthält eine einzelne NruI-Schnittstelle, die zwischen der Proteinkinase (F10L) und dem HDIR-Gen liegt. Nach Linearisierung von pORF-PB mit diesem Restriktionsenzym wurde die lacZ-Cassette (nach Auffüllreaktion) "blunt end" ligiert. Rekombinante Plasmide, die das funktionelle lacZ-Gen enthielten, wurden nach Spaltung z. B. mit BglII selektiert, und die korrekte Insertion durch Southern Blot-Hybridisierung mit einer lacZ-spezifischen Sonde sowie durch partielle DNA-Sequenzierung des Übergangs der lacZ- und Orf-DNA nachgewiesen. 40

40

45

Beispiel 4.1.2

Die gleiche Vorgehensweise wie im obigen Beispiel beschrieben wurde kurz stromabwärts des VEGF-Gens (Spaltung an der BstEII-Stelle, Abb. 1) und im potentiellen Gen ORF 3 in der ITR-Region verwendet (partieller Abbau mit XbaI, um eine Spaltung der XbaI-Stelle der mehrfachen pSPT18-Klonierungsstelle zu verhindern). 50

50

Beispiel 4.1.3

55

Um eine neue einfache Restriktionsstelle an irgendeiner gewünschten Stelle einzuführen, kann die Technik der PCR-Mutagenese verwendet werden, wie es in Abb. 10 skizziert ist und vor kurzem beschrieben wurde (Jacobs, L., H.-J. Rziha, T.G. Kimman, A.L.J. Gielkens und J.T. van Oirschot. 1993. Arch. Virol. 131, 251-264, LIT). Zu diesem Zweck werden zwei PCR-Reaktionen getrennt durchgeführt, wobei das Primerpaar E1 + EV2 (PCR A) bzw. EV1 + XB (PCR B) verwendet wird. Alle Primer decken 25 Nucleotide ab, die an den angegebenen Sequenzpositionen mit der Orf-DNA-Sequenz identisch sind. Während Primer XB die authentische Sequenz z. B. um die XbaI-Stelle herum darstellt (Abb. 1), wurde in Primer E1 am 5'-Ende eine neue EcoRI-Stelle und in die Primer EV1 und EV2 (die komplementär zueinander sind) eine neue EcoRV-Stelle eingeführt. Die EcoRV-Stelle, die in der gesamten Sequenz von pORF-1 oder -2 ursprünglich nicht vorkommt, wurde an die Stelle gebracht, die für die Einführung der lacZ-Cassette gewählt wurde. Die aus den Reaktionen A und B erhaltenen PCR-Produkte werden gereinigt, zu Einzelsträngen denaturiert und unter Reassoziationsbedingungen zusammengemischt; anschließend werden sie für die letzte Reaktion PCR C verwendet. Als Primer werden nun E1 und XB verwendet, um in diesem Beispiel die linken 793 bp von pORF-1 zu verlängern. Nach der Gelisolierung und 60

60

65

-reinigung wird das resultierende PCR-Produkt von Reaktion C mit EcoRI und XbaI gespalten und anschließend mit dem durch EcoRI und XbaI gespaltenen Plasmid pORF-XB ligiert. Als Ergebnis enthält das Plasmid pORF-1 EV (Abb. 10) die EcoRV-Restriktionsstelle an der gewünschten Position; sie kann dann für eine Linearisierung und Ligierung (mit glatten Enden) mit der lacZ-Cassette verwendet werden.

5 Außerdem können für das in diesem Beispiel beschriebene Verfahren Fehlpaarungs-Primer verwendet werden, die definierte Basenänderungen oder eine Deletion einer einzelnen Base enthalten, um z. B. Translations-Stopcodons oder Aminosäuredeletionen an jeder gewünschten Stelle in der viralen DNA-Sequenz zu erzeugen.

4.2 Intragenische Insertion ohne Deletion von Orf-Sequenzen

10 In die codierenden Sequenzen eines der beschriebenen ORFs können nach Spaltung an Restriktionsstellen, die in dem gewählten Gen nur einmal vorkommen, neue oder zusätzliche Sequenzen eingeführt werden.

Beispiel 4.2.1

15 Die singuläre XcmI-Stelle, die sich im rechten Teil des Gen-Homolog F10L befindet, wurde verwendet, um das Plasmid pORF-1 zu linearisieren. Sowohl die lacZ-Kassette als auch die gespaltene pORF-1-DNA wurden durch T4- oder Klenow-DNA-Polymerase mit glatten Enden versehen, ligiert und kompetente E. coli-Bakterien (DH5 α F) wurden für die Transformation verwendet. Die resultierenden Bakterienkolonien wurden durch 20 Kolonie-Filterhybridisierung unter Verwendung einer lacZ-spezifischen Sonde auf positive rekombinante Plasmide getestet und anschließend wurden die entsprechenden Plasmid-DNAs einer Restriktionsspaltung unterzogen. Abb. 8 zeigt schematisch die Insertion der lacZ-Kassette in die XcmI-Stelle des pORF-1. Die Plasmide pCE9 und pCE10 enthalten die 3,2 kbp große LacZ-Kassette inseriert in die XcmI-Stelle in pORF-1 (Abb. 9).

Beispiel 4.2.2

25 Der VEGF-codierende Bereich enthält eine einzelne StyI-Stelle, die wie oben beschrieben verwendet wurde, um die lacZ-Cassette zu inserieren.

4.3 Deletion viraler Sequenzen

30 Zu den folgenden Beispielen wird für die Entfernung sowohl codierende (intragenische Deletionen) als auch nichtcodierender (intergenische Deletionen) Bereiche beschrieben:

Beispiel 4.3.1

35 Durch Verwendung von Restriktionsenzymen werden definierte Teile des HindIII-DNA-Fragments entfernt, um die deletierten viralen Sequenzen zu ersetzen, indem man fremde Gene oder Teile davon insertiert. Dies erfolgte durch Spaltung des Plasmids pORF-PA mit dem Restriktionsenzym NruI (an einer Stelle im ITR-Bereich, Abb. 1), wobei ein 396-bp-Fragment beseitigt wurde. Nach einer Auffüllreaktion wurde die lacZ-Cassette wie oben beschrieben ligiert. Abb. 4 zeigt schematisch die Deletion des 396-bp-Fragmentes aus pORF-PA und die Insertion der lacZ-Kassette. Die Abb. 5 und 6 zeigen die so konstruierte Deletions-/Insertionsplasmide pCE4 und pCE5 abstammend von pORF-PA. Abb. 7 zeigt das DNA-Fragmentmuster der Plasmide pCE4 und pCE5 nach Restriktionsenzymverdau.

Beispiel 4.3.2

45 Einzelne Restriktionsstellen im HindIII-DNA-Fragment werden als Startpunkte verwendet werden, um eine bidirektionale Deletion von Sequenzen durch Einwirkung der Endonuklease Bal31 zu bewirken, wie es in Abb. 11 schematisch skizziert ist. Zum Restriktionsabbau wurden beim Plasmid pORF-PA das Enzym StyI und beim Plasmid pORF-1 oder pORF-XB das Enzym XcmI verwendet, um die Gene zu öffnen, die für VEGF bzw. Proteinkinase F10L codieren (Abb. 1 und 11). Nach Zugabe der Exonuclease Bal31 wurden alle 2 Minuten gleiche Teile der Reaktion entnommen und die Reaktion gestoppt. Spaltung der Zeitwerte z. B. mit dem Restriktionsenzym BglII und anschließende Gelelektrophoresen erlaubten die Berechnung der Größe des durch Bal31 deletierten DNA-Abschnittes. Gemische von den geeigneten Zeitpunkten wurden dann verwendet, um die DNA-Enden durch eine Auffüllreaktion zu glätten. Zwei komplementative Oligonukleotide, die neue singuläre SmaI-, SalI- und EcoRV-Restriktionsstellen darstellen, wurden hybridisiert und die resultierenden doppelsträngigen Primermoleküle (als "EcoRV"-Linker bezeichnet) an die mit glatten Enden versehenen Bal31-Produkte ligiert. Nach Transformation von Bakterien wurde Plasmid-DNA isoliert und mit EcoRV gespalten, das in der DNA-Sequenz des Orf-HindIII-Fragments keine Erkennungsstelle enthält. Daher enthielt jede Plasmid-DNA mit einer EcoRV-Stelle die inserierte Linkersequenz und wurde dann für die Ligation der mit glatten Enden versehenen lacZ-Cassette in die neue EcoRV-Stelle verwendet. Die genaue Größe der erzeugten DNA-Deletion in jeder resultierenden rekombinanten Plasmid-DNA konnte durch Sequenzieren mit den einzelsträngigen EcoRV-Linkern sowie mit geeigneten LacZ-Gen-spezifischen Primern bestimmt werden.

5. Nachweis und Identifizierung des VEGF-Gens in anderen Parapoxviren

65 Die Kenntnis des DNA-Bereichs, der in D1701 das VEGF codiert, erlaubt die Herstellung spezifischer

DNA-Sonden und PCR-Primer, um dieses Gen in anderen Parapoxvirus-Stämmen zu identifizieren, die äußerst unterschiedliche Restriktionsprofile haben können. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Möglichkeiten getestet: (i) Isolierung eines TaqI-Subfragments (366 bp groß) von pORF-PA als Hybridisierungssonde, das den Mittelteil des VEGF-Gens von D1701 darstellt; (ii) Amplifikation des vollständigen VEGF-ORF mit Hilfe geeigneter synthetischer Primer und anschließendes Plasmidklonieren des PCR-Produkts; (iii) Primer, die verschiedene Teile des VEGF-Gens abdecken, wurden für PCR in Gegenwart von PPV-DNAs als Matrizen sowie als spezifische Hybridisierungssonden verwendet.

Nach radioaktiver Markierung wurden diese Sonden erfolgreich für Southern- sowie Dot/Spot-Blot-Hybridisierung mit der genomischen DNA verschiedener Stämme von *Parapox ovis*, *Parapox bovis* 1 (Bovines papulöse Stomatitis; BPS) und *Parapox bovis* 2 (Melker-Knoten) verwendet. Nach Spaltung der DNA der verschiedenen PPV-Stämme mit Restriktionsenzymen wurde eine Hybridisierung mit definierten DNA-Fragmenten gefunden, die für eine weitere detaillierte Kartierung des Ortes des VEGF-Gens in den verschiedenen PPV-Genomen verwendet werden können. Folglich ermöglicht das Klonieren und Subklonieren der entsprechenden Fragmente die Herstellung von rekombinantem PPV, ähnlich wie es in Kapitel 4 für das Orf-Virus D1701 beschrieben ist.

Außerdem können dieselben Sonden für vergleichende RNA-Analysen, wie Northern Blot-Hybridisierung, verwendet werden, um die Expression potentieller VEGF-Gene in anderen PPV-Stämmen zu testen.

6. Erzeugung von D1701-Rekombinanten

Nach der Herstellung und Analyse von Insertions-/Deletionsplasmiden, die die lacZ-Cassette enthielten, wurden 20 µg gereinigter Plasmid-DNA zur Transfektion von Zellen verwendet, die etwa 3 Stunden lang mit D1701 infiziert worden waren. Zu diesem Zweck kann die Zelllinie BK KL-3A verwendet werden, von der sich erwiesen hat, daß sie sich effizient z. B. mit der Calciumphosphattechnik transfizieren läßt und für D1701 sowie für andere PPV-Stämme permissiv ist. Ein modifiziertes Verfahren zum Transfizieren von Zellen in Suspension wurde etabliert. Wenn eindeutige Zytopathogene Effekte auftreten, wurden die Zellen mit Agarose überschichtet, die X-gal als Substrat für β-Galactosidase enthielt, was zu einer dunkelblauen Anfärbung von Zellen führt, die lacZ-positives rekombinantes D1701 replizieren. Dann wurden blaue Plaques gepickt und wenigstens dreimal in BK-KL-3A-Zellen vermehrt und plaque-gereinigt, bis stabile lacZ-Virusrecombinante erhalten wurde.

7. VEGF-Promotor

Wie in Kapitel 3.1 skizziert, stellt das VEGF-Gen von D1701 ein frühes Gen dar, die spezifische mRNA wird in D1701 virusinfizierten Zellen von zwei bis vier Stunden nach der Infektion an bis zu späteren Zeiten der Infektion in großen Mengen transkribiert. Daher sollte der identifizierte Promotorbereich von D1701-VEGF allgemein sehr nützlich für die Steuerung der Expression fremder Gene oder Teile davon in rekombinanten PPV-Viren sein. Die Sequenz, die den VEGF-Promotor umfaßt (35 bis 40 Nucleotide; Sequenz Protokoll ID6), kann isoliert werden durch (i) PCR unter Verwendung der entsprechenden Primer, die den Promotorbereich flankieren, (ii) Subklonieren des entsprechenden DNA-Fragments oder (iii) Synthetisieren der Promotorsequenz als Oligonucleotid. Nach der Verknüpfung des VEGF-Promotors mit jedem interessierenden Gen oder einer DNA-Sequenz kann die resultierende Gen-Kassette zur Herstellung von rekombinantem PPV nach irgendeinem Verfahren, wie es in den vorangehenden Kapiteln beschrieben ist, verwendet werden.

Literaturverzeichnis

1. Robinson A.J., Lyttle D.J.
Recombinant Poxviruses ed. by M.M. Binns, Geb. Smith CRC Press Boca Raton 1992 p 285—327
2. A. Mayr, M. Büttner
Chapter 7 (Ecchyma (Orf) Virus) in: Virus Infections of Vertebrates, Vol. 3: Virus Infections of Ruminants, 1990, Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands
3. Mazur, C.; Rangel-Filho, F.B.; Galler, R
Molecular analysis of contagious pustular dermatitis virus: a simplified method for viral DNA extraction from scab material (1991) J. Virol. Methods 35, 265—272
4. A.A. Mercer et. al.
10th Int. Conf. on Poxviruses and Iridoviruses 30. April—5. May 1994 Proceedings
5. Fleming, S.B. et al.
Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf virus reveals a 3.3 kbp region of non-essential DNA (1995)
J. gen. Virol 76, 2969—2978
6. Lyttle, D.J., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Mercer, A.A., Robinson, A.J.
Homologs of Vascular Endothelial Growth Factor are encoded by the poxvirus Orf virus. (1994) J. Virol. 68, 84—92
7. Sutter, G., Moss, B Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847—10851
8. Naase, M.; Nicholson, B.H.; Fascer, K.M.; Mesces, A.A.; Robinsin, A.J.
An orf virus sequence showing homology to the 14K "fusion" protein of vaccinia virus (1991) J. gen. Virol. 72, 1177—1181.

DE 196 39 601 A1

In den im Sequenzprotokoll beschriebenen Sequenzen ID No 1-11 werden folgende Angaben gemacht:

ID NO 1

5 Die Sequenz ID1 der Anmeldung zeigt das auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte VEGF-Gen.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 3361 bis 3900 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

Zusätzliche Informationen:

Early promotor: Nukleotide 48 bis 65

10 5'-Ende mRNA: Nukleotide 79 bzw. 80

3'-Ende mRNA: Nukleotide 498 bis 500

Startcodon: Nukleotide 92 bis 94

Stopcodon: Nukleotide 488 bis 490

15 ID NO 2

Die Sequenz ID2 der Anmeldung zeigt das auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte Proteinkinase-Gen.

Sie entspricht den Nukleotidposition 1180 bis 2921 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

20 Zusätzliche Informationen:

Late promotor Core-motif: Nukleotide 48 bis 66

RNA-Startsignal: Nukleotide 72 bis 80

5'-Ende mRNA: Nukleotid 88

Startcodon: Nukleotide 94 bis 96

25 Stopcodon: Nukleotide 1738 bis 1740

ID NO 3

30 Die Sequenz ID3 der Anmeldung zeigt das auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte HD1R-Gensegment.

Sie entspricht den Nukleotidposition 1 bis 1080 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

Zusätzliche Informationen:

Stopcodon: Nukleotide 1075 bis 1077

35 ID NO 4

Die Sequenz ID4 der Anmeldung zeigt die auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte ITR-Region und das in dieser Region befindliche ORF3-Gen.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 3901 bis 5515 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

40 Zusätzliche Informationen:

Beginn ITR-Region: Nukleotid 5

Early promotor: Nukleotide 19 bis 30

Startcodon ORF3: Nukleotide 111 bis 113

Stopcodon ORF3: Nukleotide 562 bis 564

45 ID NO 5

Die Sequenz ID5 der Anmeldung zeigt das auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte F9L-Gen.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 2582 bis 3580 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

Zusätzliche Informationen:

Startcodon: Nukleotide 48 bis 50

Stopcodon: Nukleotide 861 bis 863

55 ID NO 6

Die Sequenz ID6 der Anmeldung zeigt die auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte VBGF-Promotor-Region.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 3387 bis 3478 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

60 Zusätzliche Informationen:

Early promotor consensus: Nukleotide 24 bis 41

Transkriptions-Startpunkt: Nukleotide 53 bis 55

Startcodon: Nukleotide 68 bis 70

65 ID NO 7

Die Sequenz ID7 der Anmeldung zeigt die auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte, zwischen dem HD1R- und dem PKF10L-Genen gelegene intergenische Region.

DE 196 39 601 A1

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 1051 bis 1300 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).
Stopcodon HD1R: Nukleotide 24 bis 26
Startcodon PKF10L: Nukleotide 223 bis 225

ID NO 8

5

Die Sequenz ID8 der Anmeldung zeigt die vollständige Nukleotidsequenz des HindIII/I-Fragmentes des ORF-Stammes D1701.

ID NO 9

10

Die Sequenz ID9 der Anmeldung zeigt eine Variante des auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierten Proteinkinase-Gens.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 1180 bis 2799 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

Zusätzliche Informationen:

15

Late promoter Core-motif: Nukleotide 48 bis 66

RNA-Startsignal: Nukleotide 72 bis 80

5'-Ende mRNA: Nukleotid 88

Startcodon: Nukleotide 94 bis 96

Stopcodon: Nukleotide 1583 bis 1585

20

ID NO 10

25

Die Sequenz ID10 der Anmeldung zeigt eine Variante des auf dem HindIII/I-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierten F9L-Gens.

Sie entspricht den Nukleotidpositionen 2680 bis 3459 des HindIII/I-Fragmentes (ID8).

Zusätzliche Informationen:

25

Startcodon: Nukleotide 48 bis 50

Stopcodon: Nukleotide 722 bis 724

30

ID NO 11

35

Die Sequenz ID9 der Anmeldung zeigt ein auf dem EcoRI/E-Fragment des Stammes ORF D1701 lokalisierte 10 kD-Genfragment.

35

40

45

50

55

60

65

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bayer AG
- (B) STRASSE: Bayerwerk
- (C) ORT: Leverkusen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-51368
- (G) TELEFON: 0214 / 3061285
- (H) TELEFAX: 0214 / 303482
- (I) TELEX: 85 101-265 by d

10 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Parapockenviren, die Fremd-DNA
enthalten, ihre Herstellung und ihre Verwendung in Impfstof-
fen

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 540 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

45

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 VEGF-Gen

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGTGGCGCTAC CAATTCGCGC GGCCGGCCGC GCTGCGCGCG TAGCCGCGCA AAATGTAAAT
60

55

TATAACGCCA AACTTTAAG GGTGAGGCGC CATGAAGTTT CTCGTCGGCA TACTGGTAGC
120

60

TGTGTGCTTG CACCAAGTATC TGCTGAACGC GGACAGCACCG AAAACATGGT CCGAAGTGGT
180

65

TGAAAACAGC GGGTGCAAGC CAAGGCCGAT GGTCTTTCGA GTACACGACG AGCACCCGGA
240

GCTAACTTCT CAGCGGTTCA ACCCGCCGTG TGTCACGTTG ATGCGATGCG GCGGGTGCTG
300

CAACGACGAG AGCTTAGAAT GCGTCCCCAC GGAAGAGGCA AACGTAACGA TGCAACTCAT
360

GGGAGCGTCG GTCTCCGGTG GTAACGGGAT GCAACATCTG AGCTTCGTAG AGCATAAGAA
420

ATGCGATTGT AAACCACAC TCACGACCAC GCCACCGACG ACCACAAGGC CGCCCAGAAG
480

ACGCCGCTAG AACTTTTAT GGACCGCATA TCCAAACGAT GATGCGATCA GGTCAATGCGG
540

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1740 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 Proteinkinase-Gen

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGAGTGACTG CCCATCCCGT TGCTGCGCGA CTCGGGACTG CCCTCTGTTT TTCTTCCCG
60

20

TTTCTTCTTA TTAGGTAGTT GTTGCCCACC TCCATGATCC TCGCACGCGC TGGCGGGCGA
120

25

CCTCGCACGC CCGCGGCCGC CGCGGCCGCC GCCGAGGACG GCAAGAACAG TGATCGCCGG
180

30

AAGCGCAAGC GCAAGACGCC CAACTGCGAA GACGCCGACA ACTCCGACGA CGAGCTAGCG
240

35

CAGACGCCGT GCGACCGCGA GTGGCCGGAC TGTCGCGCGA GCTCGATCAC GAGCTCCGAC
300

40

TCGGTCTCTC TCGCGACGA GATCTACTTG CGGTACGTAG CCTCGCAGGT GGACTTCGCG
360

45

CAGACCTGGG CCCCCCGGT GCGGCTGCTG CGCTTCTTCG GGAACCTCTC GAAGGAAACG
420

50

CTCAGCCGCA TGTGCGGGCG CGGGTACGTG AACCGCTCCT ACTTCCAGAT GGCGCACGCG
480

55

CGCTTCTCGC CCACCAACGA CGACATGTAC CACATGCCA CTGGCGGGTA CGGCATCGTG
540

60

65

DE 196 39 601 A1

TTCCGCTTCG ACCGCTACGT GGTCAAGTAC GTCTTCGAGC ACCGCACGG CATGTCCGAG
600
5 ATGGACGCCT CTACGGAGTA CACGGTGCCG CGGTTCCCTGC GCAATAACCT CAAGGGCGAC
660
GAGCGCGAGT TCGTGGTCTG CGCGCTGGCC ATGGGGCTGA ACTACCGGCT GGGCTTCCTG
720
10 CACTCGCTGT ACCGGCGCGT GCTGCACACG CTGCTGCTGC TCATGCACGT GGAGGAAGGC
780
CAGCGGCCCT CGGTAGAGAT GCCCAAGAAG CCGCTGCTGC GCTGGTTCGA GGCGCCGAAG
840
15 GACAGCGAGT CCTTCGTGCG CCTGGTCTCG TACTTCTACC CCTCGGCCGT GCAGAGCAAC
900
GTGAACCTGA TCAACAACTT CCACCACCTG GTGCACTTCT TTGAGCACGA GAAGCGCGCG
960
20 CGGTACGTGT TCGACCGCGG GGCGTGATC GTGTTCCCTC TGGCGCGCG GTCCGCGGAC
1020
TCGATCTCGC CGGAGGCAGC GGCAGCGCTG GGCTTCGCGC CGCACTCGGA GTTCTCAAG
1080
25 TTCGTGTTCC TGCAGATCGC GCTGCTGTAC CTGAAGATAT ACGAGCTCCC GGGCTGCACG
1140
AACTTCTGC ACGTGGACCT GAAGCCGAC AACGTGCTCA TCTTCGACAG CGCGCCGGCT
1200
CAGCGTGACT GCGGCCGGTG CGACTTTCTG CTTCGAAGAG CCCGTGCGCG CGGCGCTGAA
1260
30 CGACTTCGAC TTGCGCGCG TGGCCACCAT CGAGAACCGC AAGATCGCGG GCAGCGTCCG
1320
CGTGCCGAG AACTGGTACT ACGACTTCCA CTTCTTCGCG CACACGCTGC TGCGCGCTA
1380
40 CCCGCACATC GCCGCGGAGG ACCCGGGCTT CCACGCGCTG CTCTCGGAGC TCACGGTCTC
1440
GTGCTCGCGC GGGACCTGCG ACCGCTTCG GCTGCGCGTG TCCTCGCCGC ACCCCATCGA
1500
45 GCACCTCGCG CGGCTGGTGC GCCGCGACGT CTTCTCCCGC TGGATAAAATG CCGCCGGCGA
1560
CGCCCCCGAC GCCGCACTCT CCTGAGCCCA CGCCCGCGGC GCCGGGCTCG CTGTACGACG
1620
50 TCTTCCTCGC GCGCTTCCTG CGCCAGCTGG CCGCGCGCGC GGCGCCGGCC TCGGCCGCCT
1680
GCGCCGTGCG CGTGGGTGCG GTGCGCGGCC GCCTGCAGAA CTGCGAGCTG GTGGTGCTGA
1740
55

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1140 Basenpaare
65 (B) ART: Nucleotid

DE 196 39 601 A1

(C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

10

(A) ORGANISMUS: Parapox ovis
 (B) STAMM: D1701 HD1R-Gen

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

15

AAGCTTGTG CGCGAGTACG TGGTGACCCG CGCCTACTCG GATCAGACCG AGCCGATCAT
 60

20

GGACTTGCTC ATCGGCATGG GCGCCGACGT GGACATGCAG GTCGGCGTGT GCCGCACGGC
 120

GCTGCACGCC TGCCTTACGG GCTTGAACAC GAACCCGTGC ATGATTGCGC CGCTGCTTCG
 180

25

GCGCGGCCGAGC AGCGTGACCG CAAAAGACAC CTACGAGATG ACGCCACTGG CGTGTGCTG
 240

AAGTCCGCGA GCGCGACGCC GGAGCTCGTGC CGCATCCTCG TGGAAAGCAGG CTCCGACGTG
 300

30

AGCGCCACCG ACTTCCGCCT CAACGGCATG CTGCACCAAGC ACGCAGTCCA CGCGCCCGCG
 360

CGCGAGCGTC ATGCGCGAGC TCATCCGGCT GGGGTGCAGC CCAGCGGCCA AAAACATGTT
 420

35

TGGGAACACG CCGATGCACA TGCTGGCCAT GGAAAGCTCC TGCCGCCGCT CGCTGATCC
 480

CCCGCTGCTG GAGGCAGGGC TTTCCGTGAA CGAGGAGAAC CTGCACGTACG GCACCGTGCC
 540

40

TCTGCACGTG GCCTCGGGGT ACGACAACAC GCAGGGCTGC CTCAAGCTCC TCCGGCAGGG
 600

AGGAGACCCC ACCGTGGTGT CAGCCGCCGG ACGCACACCG ATCTCGAAC A TGCTCGTCAA
 660

45

AGCCAACCAC GTGGCGGTG CGGGCGCGCT GTCGACGCAC CCGAGCGCGG CAGTGGTGT
 720

50

GCAGGGCTTC GAGCAGGCTC TCGAGAACGT GCTGAACGCC GGGCCCAGCG AGGCCTCGCG
 780

GCTCGCCGTG GCCTTTGTGG TGGCGCGCGC CGGCGCATCC GCGCTACCGG AGGCCGTGCG
 840

55

CCGTCTTCAC GAGGGCTTCG TCGCCGACTG CGAGCGCGAA GTCGCGTTGC TTTCCCGCAG
 900

CATGCTCGGC ACACCGGCCG TGAGCGCGCT GGTGCGTGTG GTCAGCAAGG AGGTCTTTGG
 960

60

CACTGTTATC TCCTCGCGTG CGCTGCGCGT CGCGCGGGAG GTCCGGCGTGT ACGCAAAGGCC
 1020

65

GCTCCGCGAG GCGCTCATAA ATCTGCGCCA CAAATGCCGC TTAGTTCCA GCCTTAAAAG
 1080

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1616 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 ITR und ORF3-Gen

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

AAGGAGGCTC CACGGAGCAA AGTGAAAAAG GACCGCCTAG AGTCGAGACC CCTCCCTCCC
 60

30 GCCTCGGGCA AACCCACAGC CGCCGCAAAC ACCACACCCG CCGACCTACC ATGCACCCCT
 120

CGCCGCGCCG GCTGCTCGGC GCGCTCGCGC TGCTGGCGCT GGGCTTCGCT CGGCGCGCTC
 180

35 TTCGCCCCGC GGCGCCGCTC GTGCCGGCCG CCTTCCTGGA GGTGGGGCAC GTGCGCGCA
 240

ACCCGTCCGC CTCGGTGACC TGCCTCACGG TGGGCGGCCA CGGGCGGCAC ATGGCGCGG
 300

40 TCGCGCACGG CGGGGGACG CTCTCGCCGG TGTACCCGCT GGCGCCGGC ATGCACGCGA
 360

CCTTCTCCTC CGCGCGCAAG GGCGCGCTGC TGCTAACGT CGCGACCGTG ACTGGTGTACG
 420

45 ACGTGCACGC GCTCGCCCCC GAGTCGAGC TCGTCTGCAT CGCGGTGGTC GGCGGCTACA
 480

50 ACTCGGCCGC GGCGCCACG CGGCCCGCGG CCGAGTGGCA CGGCCAGCTG GAGCTGCGCC
 540

55 GCTCGGAGCT GTGACCCCTC CCTCCCCGGT CTCCCTCTGT CTTTGTAAATC GGCCTTAGAG
 600

ATTAGACATC ATCCTCCACG CCTCTTTGTC CGCCGCCCTT CTTCGCGGAC GGATGAACCA
 660

65 ATTAATTAAT TATTTTGTGTC GCTCGCCCGC TCACTCCGGC AAGGGAACGA GTGACGTTAA
 720

CTCTCTCACC CTCACGCACA AGAACAAAGAA CCGCTCACTC ACCGGGCAAG GGAACACGGT
 780

TAAGGTCAAC TCACTCGCGA GAACAAAGTG ACCCTCACTC TAGAGAACGA GGAACGGGCA
 840

65

DE 196 39 601 A1

180 TCTTCCTCGC GCGCTTCCTG CGCCAGCTGG CCGCGCGCGC GCGCGCGGCC TCGGCGCGCT' 5
5 GCGCCGTGCG CGTGGGTGCG GTGCGCGGCC GCCTGCGGAA CTGCGAGCTG GTGGTGCTGA
240
10 ACCGCTGCCA CGCGGACGCT GCCGGCGCGC TCGCGCTGGC CTCCGCGCGC CTGGCGGAAA
300
15 CGCTGGCGGA GCTGCCGCGC GCGGACAGGC TCGCCGTGCG CGCGAGCTG GCGGTGGACC
360
20 CAGAGCACCC GGAGCTGACG CCGGACCCCG CCTGCGCGGG CGAGAGGCCGC GCTTGCGCAG
420
25 AACATCGACA TCCAGACGCT GGACCTGGGC GACTGCGCG ACCCCAAAGG CCGCCGACTG
480
30 CGCGTGGCGC TGGTGAACAG CGGCCACCGCG GCCGCAAACG GCGCGCTGCG GCGCGTAGCG
540
35 ACCGCGCTGA CGCGCCGGT GCCCGCAAGC CGGCACGGCC TCGCGGAGGG CGGCACGCCG
600
40 CCGTGGACGC TGCTGCTGGC GGTGGCCCGCG GTGACGGTGC TCAGCGTGGT GGCGGTTTCG
660
45 CTGCTGCGGC GCGCGCTGCG GGTGCGCTAC CAATTGCGGC GGCGGGCGC GCTGCGCGC
720
50 TAGCCGGCA AAATGTAAAT TATAACGCCA AACTTTTAAG GGTGAGGCCGC CATGAAGTTT
780
55 CTCGTGGCA TACTGGTAGC TGTGTGCTTG CACCAAGTATC TGCTGAACGC GGACAGCACG
840
60 AAAACATGGT CCGAAGTGTG TGAAAACAGC GGGTGCAAGC CAAGGCCGAT GGTCTTTCGA
900

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 VEGF-Promotor

60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGGCGCTGCG CGCGCGTAGC CGCGAAAT GTAAATTATA ACGCCCAACT TTTAAGGGTG
60

AGGCGCCATG AAGTTTCTCG TCGGCATACT GGT
94

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 250 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

20

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 Region zwischen Proteinkinase- und HD1R-Gen

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAAATGCCGC TTAGTTCCA GCCTTAAAAG GCAAGTGGGA CCCTGCTCGC TGCCCGGCGA
60

30

ACTGGTGGAG CGCGTGCTCG CGACCGTGCC ACTGGCCGAC TTGCGCCGCT CGTGCAGCCG
120

CCGCGCGCCC GAGTGACTGC CCATCCCGTT GCTGCGCGAC TCGGGACTGC CCTCTGTTT
180

35

TCTTTCCCGT TTCTTCTTAT TAGGTAGTTG TTGCCCACCT CCATGATCCT CGCACGCGCT
240

GGCGGGCGAC
250

40

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5516 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

60

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 HindIII/i

65

DE 196 39 601 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

5 AAGCTTGTG CGCGAGTACG TGGTGACCCG CGCCTACTCG GATCAGACCG AGCCGATCAT
 60
 10 GGACTTGCTC ATCGGCATGG GCGCCGACGT GGACATGCAG GTCGGCGTGT GCCGCACGGC
 120
 15 GCTGCACGCC TGCCTAACGG GCTTGAACAC GAACCCGTGC ATGATTGCG CGCTGCTTCG
 180
 20 GCGCGGCCGCC AGCGTGACCG CAAAAGACAC CTACGAGATG ACGCCACTGG CGTGTGCTG
 240
 25 AAGTCCGCGA GCGCGACGCC GGAGCTCGTG CGCATCCTCG TGGAAAGCAGG CTCCGACGTG
 300
 30 AGCGCCACCG ACTTCCGCCT CAACGGCATG CTGCACCAGC ACGCAGTCCA CGCGCCCGCG
 360
 35 CGCGAGCGTC ATGCGCGAGC TCATCCGGCT GGGGTGCAGC CCAGCGGCCA AAAACATGTT
 420
 40 TGGGAACACG CCGATGCACA TGCTGGCCAT GGAAAGCTCC TGCCGCCGCT CGCTGATCCT
 480
 45 CCCGCTGCTG GAGGCAGGGC TTTCCGTGAA CGAGGAGAAC CTGCACTACG GCACCGTGCC
 540
 50 TCTGCACGTG GCCTCGGGGT ACGACAACAC GCAGGGCTGC CTCAAGCTCC TCCGGCAGGG
 600
 55 AGGAGACCCC ACCGTCGTGT CAGCCGCCGG ACGCACACCG ATCTCGAAC A TGCTCGTCAA
 660
 60 ACGCAACCAC GTGGCGGTG CGGGCGCGCT GTGCACGCAC CCGAGCGCGG CAGTGGTCGT
 720
 65 GCAGGCTCTC GAGCAGGCTC TCGAGAACGT GCTGAACGCC GGGCCAGCG AGGCCTCGCG
 780
 70 GCTCGCCGTG GCCTTTGTGG TGGCGCCGCC CGGCGCATCC GCGCTACCGG AGGCCGTGCG
 840
 75 CCGTCTTCAC GAGGGCTTCG TCGCCGACTG CGAGCGCGAA GTCGCGTTGC TTTCCCGCAG
 900
 80 CATGCTCGGC ACACCGGCCG TGAGCGCGCT GGTGCGTGT GTCAGCAAGG AGGTCTTTGG
 960
 85 CACTGTTATC TCCTCGCGTG CGCTGCGCGT CGGGCGGGAG GTCCGCGTGT ACGCAAGGCC
 1020
 90 GCTCCGCGAG GCGCTATAA ATCTGCGCCA CAAATGCCGC TTAGTTCCA GCCTTAAAAG
 1080
 95 GCAAGTGGGA CCCTGCTCGC TGCCCGGCCA ACTGGTGGAG CGCGTGCTCG CGACCGTGCC
 1140
 100 ACTGGCCGAC TTGCGCCGCT CGTGCAGCCG CGCGCGGCC GAGTGACTGC CCATCCCGTT
 1200
 105 GCTGCGCGAC TCGGGACTGC CCTCTGTTTT TCTTTCCCGT TTCTTCTTAT TAGGTAGTTG
 1260
 110 TTGCCCCACCT CCATGATCCT CGCACGCGCT GGCGGGCGAC CTCGCACGCC CGCGCGGCC
 1320

65

DE 196 39 601 A1

GCGGCGGCCG CCGAGGACGG CAAGAACAGT GATGCCCGA AGCGCAAGCG CAAGACGCC
 1380

AACTGCGAAG ACGCCGACAA CTCCGACGAC GAGCTAGCGC AGACGCCGTG CGACCGCGAG
 1440

TGGCCGGACT GTCGCGCGAG CTCGATCACG AGCTCCGACT CGGTCTCTCT CGGCGACGAG
 1500

ATCTACTTGC GGTACGTAGC CTCGCAGGTG GACTTCGCGC AGACCTGGC CCCGCCGGTG
 1560

CGGCTGCTGC GCTTCTTCGG GAACTTCTCG AAGGAAACGC TCAGCCGCAT GTCGCGCGC
 1620

GGGTACGTGA ACCGCTCCTA CTTCCAGATG GCGCACGCGC GCTTCTCGCC CACCAACGAC
 1680

GACATGTACC ACATGGCAC TGGCGGGTAC GGCATCGTGT TCCGCTTCGA CCGCTACGTG
 1740

GTCAAGTACG TCTTCGAGCA CCGCAACGGC ATGTCCGAGA TGGACGCCCTC TACGGAGTAC
 1800

ACGGTGCCGC GGTTCTGCG CAATAACCTC AAGGGCGACG AGCGCGAGTT CGTGGTCTGC
 1860

GCGCTGGCCA TGGGGCTGAA CTACCGGCTG GGCTTCTGC ACTCGCTGTA CGGGCGCGTG
 1920

CTGCACACGC TGCTGCTGCT CATGCGCGTG GAGGAAGGCC AGCGGCCCTC GGTAGAGATG
 1980

GCCAAGAACGC CGCTGCTGCG CTGGTTCGAG GCGCGCAAGG ACAGCGAGTC CTTCGTGC
 2040

CTGGTCTCGT ACTTCTACCC CTCGGCCGTG CAGAGCAACG TGAACCTGAT CAACAACCTC
 2100

CACCACTGG TGCACTTCTT TGAGCACCGAG AAGCGCGCGC GGTACGTGTT CGACCGCGGG
 2160

GCCGTGATCG TGTTCCCTCT GGCGCGCGGG TCCGCGGACT CGATCTCGCC GGAGGCGCG
 2220

GCAGCGCTGG GCTTCGCGCC GCACTCGGAG TTCTCAAGT TCGTGTTCCT GCAGATCGCG
 2280

CTGCTGTACC TGAAGATATA CGAGCTCCCG GGCTGCACGA ACTTCCTGCA CGTGGACCTG
 2340

AAGCCCGACA ACGTGCTCAT CTTCGACAGC GCGCGCGCGC TCAGCGTGAC TGCGGCCGGT
 2400

GCGACTTTTC GCTTCGAAGA GCCCGTGCAGC GCGCGCGCTGA ACGACTTCGA CTTCGCGCGC
 2460

GTGGCCACCA TCGAGAACCG CAAGATCGCG GGCAGCGTCC GCGTGCACGA GAACTGGTAC
 2520

TACGACTTCC ACTTCTTCGC GCACACGCTG CTGCGCGCGT ACCCGCACAT CGCCGCGGGAG
 2580

GACCCGGGCT TCCACGCGCT GCTCTCGGAG CTCACGGTCT CGTGCTCGCG CGGGACCTGC
 2640

GACCGCTTCC GGCTGCGCGT GTCCTCGCCG CACCCCATCG AGCACCTCGC GCGGCTGGTG
 2700

DE 196 39 601 A1

CGCCGCGACG TCTTCTCCG CTGGATAAAAT GCCGCCGGG ACGCCCGCGA²⁷⁶⁰ CGCCGCACTC
 2760
 5 TCCTGAGCCC ACGCCCGGG CGCCGGGCTC GCTGTACGAC GTCTTCCCTCG CGCGCTTCC
 2820
 GCGCCAGCTG GCCGCCGCG CGGCCGCCGGC CTCGGCCGCC TGCGCCGTGC GCGTGGGTGC
 2880
 10 GGTGGCGGGC CGCCTGCCGA ACTGCCAGCT GGTGGTGTGC AACCGCTGCC ACGCGGACGC
 2940
 TGCCGGCGCG CTCGCGCTGG CCTCCGCCGGC GCTGGCGGAA ACGCTGGCGG AGCTGCCGCG
 3000
 15 CGCGGACAGG CTCGCCGTGC CGCGCGAGCT GGGCGTGGAC CCAGAGCACC CGGAGCTGAC
 3060
 GCCGGACCCC GCCTGCGCGG GCGAGAGCGC GCTTGCAG AACATCGACA TCCAGACGCT
 3120
 20 GGACCTGGGC GACTGCGCG ACCCCAAAGG CCGCCGACTG CGCGTGGCGC TGGTGAACAG
 3180
 CGGCCACGCG GCCGCAAACG GCGCGCTCGC GCGCGTAGCG ACCGCGCTGA CGCGCCGCGT
 3240
 25 GCCCGCAAGC CGGCACGGCC TCGCGGAGGG CGGCACGCCG CCGTGGACGC TGCTGCTGGC
 3300
 GGTGGCGCG GGTGACGGTGC TCAGCGTGGT GCGGGTTTCG CTGCTGCCGC GCGCGCTGCG
 3360
 30 GGTGCGCTAC CAATTGCGC GGCGGCCGC GCTGCGCGC TAGCCGCGCA AAATGTAAAT
 3420
 35 TATAACGCCA AACTTTAAG GGTGAGGCCG CATGAAGTTT CTCGTCGGCA TACTGGTAGC
 3480
 TGTTGCTTG CACCAAGTATC TGCTGAACGC GGACAGCACG AAAACATGGT CCGAAGTGT
 3540
 40 TGAAAACAGC GGGTGCAAGC CAAGGCCGAT GGTCTTTCGA GTACACGACG AGCACCCGGA
 3600
 GCTAACTTCT CAGCGGTTCA ACCCGCCGTG TGTACGTTG ATGCGATGCG GCGGGTGTG
 45 3660
 CAACGACGAG AGCTTACAAT GCGTCCCCAC GGAAGAGGCA AACGTAACGA TGCAACTCAT
 3720
 GGGAGCGTCG GTCTCCGGTG GTAACGGGAT GCAACATCTG AGCTTCGTAG AGCATAAGAA
 50 3780
 ATGCGATTGT AAACCACAC TCACGACCAAC GCCACCGACG ACCACAAGGC CGCCCAAGAAG
 3840
 55 ACGCCGCTAG AACTTTTAT GGACCGATA TCCAAACGAT GATGCGATCA GGTCACTGCGG
 3900
 AAGGAGGCTC CACGGAGCAA AGTAAAAAG GACCGCCTAG AGTCGAGACC CCTCCCTCCC
 3960
 60 GCCTCGGGCA AACCCACAGC CGCCGAAAC ACCACACCCG CCGACCTACC ATGCACCCCT
 4020
 CGCCGGCGCG GCTGCTCGGC GCGCTGCCGC TGCTGGCGCT GGGCTTCGCT CGGGCGCGTC
 4080
 65

DE 196 39 601 A1

TTGCCCCCGC GGCGCCGCTC GTGCCGGCG CCTTCCTGGT GGTGGGGCAC GTGCCGCGA
 4140

ACCCGTCCGC CTCGGTGACC TGCCTCACGG TGGGCCGGCA CGGGCGGCAC ATGGCGCGG
 4200

TCGCGCACGG CGGCAGGACG CTCTCGCCGG TGTACCCGCT GGCGCCGGC ATGCACGCGA
 4260

CCTTCTCCTC CGCGCGCAAG GGCGCGCTGC TGCTAACGT CGCGACCGTG ACTGTGTACG
 4320

ACGTGCAGCG GCTCGCCCCC GAGTTCGAGC TCGTCTGCAT CGCGGTGGTC GGCGGCTACA
 4380

ACTCGGCCGC GGCGGCCACG CGGCCCGCGG CCGAGTGGCA CGGCCAGCTG GAGCTGCC
 4440

GCTCGGAGCT GTGACCCCTC CCTCCCCGGT CTCCCTCTGT CTTTGTAAATC GGCCTTAGAG
 4500

ATTAGACATC ATCCTCCACG CCTCTTGTGCG CGCCGCCCTT CTTCGCGGAC GGATGAACCA
 4560

ATTAATTAAT TATTTTTGTC GCTCGCCCGC TCACTCCGGC AAGGGAACGA GTGACGTTAA
 4620

CTCTCTCACC CTCACGCACA AGAACAAAGAA CCGCTCACTC ACCGGGCAAG GGAACACGGT
 4680

TAAGGTCAAC TCACTCGCGA GAACAAGTTG ACCCTCACTC TAGAGAACGA GGAACGGGCA
 4740

ACAAGCAACC GTCAACTCAC TTACCACCGAG AACAAAGTTGA CCGCCACTCA AAGGGAACAG
 4800

AGAACAGTAA CCGTTCTCGC TCGCTCGGAA CAATAGAACCA AGTTAACGTC AACTCGCTCG
 4860

CTCGGTGTAA GAGAACAAACA GAACAAGCAA CTGTTGACCA CTCAACCCCC GGAGAACAGA
 4920

ACAAGAGAGC AGTCAACTCA CCCACTCACT CTTGGATGAG AGGAGGACGA GTTAACGAGT
 4980

ACTCGCACGC AGAGTGAGAG AGTGAGGACA TAATAATAGT TAACGAGTTA ATACTCACTC
 5040

GCTCACTCAG AGTGAGAGAG AACCAAGTGAG CGAGTTAACCG GCGCACACGA GCGAGAGAAC
 5100

AGTGAACCTGC TCGCGCGCTC GCTCGGTAGC AGTCGGCCCTT TCTTAAAACG GTTCGTAAAA
 5160

CTTTTCCCGA GACAGTTCAC CCTCCAAAAC TTTTAAAACG AAAACTCGGAG GTGGCCTGCC
 5220

CTCCACTCTC CGTAAAACCTT TTGTAAAACG GTCGGAGGTC GGTGACTTC GCAACTCGTC
 5280

CGCGAAAACG TTTCGTGGGC AGTGTCTGCC TCTCTCAGGC TCCTCGCAGTC ACTTTCGCGG
 5340

AGCCTCGAGG TAGGTACACT CTCTCCAAAAC TTTTGTAAAA ACTTTTTCGC GGAGCCTCTG
 5400

GAGGCCGTCC TCCCTCCAAA ACTTTTCGTA AAATCTCTTC GGAGGCCGTC CTCCCTCCAA
 5460

AACTTTTCGT AAAATCTTG GGAGGTCGAC CTCCCTCAA ACTTTTATA AAGCTT
5516

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1620 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

20

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Parapox ovis
 (B) STAMM: D1701-Proteinkinase Gen-Variante

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

30

CGAGTGACTG CCCATCCCGT TGCTGCGCGA CTCGGGACTG CCCTCTGTT TTCTTTCCCG
60

35

TTTCTTCTTA TTAGGTAGTT GTTGCCACC TCCATGATCC TCGCACCGCGC TGGCGGGCGA
120

40

CCTCGCACGC CCGCGGCGGC CGCGGCGGCC GCCGAGGACG GCAAGAACAG TGATGCCGG
180

45

AAGCGCAAGC GCAAGACGCC CAACTGCGAA GACGCCGACA ACTCCGACGA CGAGCTAGCG
240

50

CAGACGCCGT GCGACCGCGA GTGGCCGGAC TGTGCGCGA GCTCGATCAC GAGCTCCGAC
300

55

TCGGTCTCTC TCGGCGACGA GATCTACTTG CGGTACGTAG CCTCGCAGGT GGACTTCGCG
360

60

CAGACCTGGG CCCCCCGGGT GCGGCTGCTG CGCTTCTTCG GGAACTTCTC GAAGGAAACG
420

65

CTCAGCCGCA TGTGCGCGC CGGGTACGTG AACCGCTCCT ACTTCCAGAT GGCGCACGCG
480

70

CGCTTCTCGC CCACCAACGA CGACATGTAC CACATGGCCA CTGGCGGGTA CGGCATCGTG
540

75

TTCCGCTTCG ACCGCTACGT GGTCAAGTAC GTCTTCGAGC ACCGCAACGG CATGTCCGAG
600

80

ATGGACGCCT CTACGGAGTA CACGGTGCCT CGGTTCTGC GCAATAACCT CAAGGGCGAC
660

85

GAGCGCGAGT TCGTGGCTG CGCGCTGGCC ATGGGGCTGA ACTACCGGCT GGGCTTCCTG
720

90

CACTCGCTGT ACCGGCGCGT GCTGCACACG CTGCTGCTGC TCATGCCGT GGAGGAAGGC
780

95

DE 196 39 601 A1

CAGCGGCCCT CGGTAGAGAT GCCCAAGAAG CCGCTGCTGC GCTGGTTCGA GGCGCGCAAG
840

GACAGCGAGT CCTTCGTGCG CCTGGTCTCG TACTTCTACC CCTCGGCCGT GCAGAGCAAC
900

GTGAACCTGA TCAACAACTT CCACCACCTG GTGCACTTCT TTGAGCACGA GAAGCGCGCG
960

CGGTACGTGT TCGACCGCGG GGCGTGTGATC GTGTTCCCTC TGGCGCGCGG GTCCGCGGAC
1020

TCGATCTCGC CGGAGGCGGC GGCAAGCGCTG GGCTTCGCGC GGCACTCGGA GTTCTCAAG
1080

TTCGTGTTCC TGCAGATCGC GCTGCTGTAC CTGAAGATAT ACGAGCTCCC GGGCTGCACG
1140

AACTTCCTGC ACGTGGACCT GAAGCCCGAC AACGTGCTCA TCTTCGACAG CGCGCGCG
1200

CTCAGCGTGA CTGCGGCCGG TGCGACTTT CGCTTCGAAG AGCCCGTGC CGCGGCCGCTG
1260

AACGACTTCG ACTTCGCGCG CGTGGCCACC ATCGAGAACCC GCAAGATCGC GGGCAGCGTC
1320

CGCGTGC CGC AGAACTGGTA CTACGACTTC CACTTCTCG CGCACACGCT GCTGC CGCG
1380

TACCCGCACA TCGCCGCCGA GGACCCGGGC TTCCACGCGC TGCTCTCGA GCTCACGGTC
1440

TCGTGCTCGC GCGGGACCTG CGACCGCTTC CGGCTGC CGCG TGTCCTCGCC GCACCCCATC
1500

GAGCACCTCG CGCGGCTGGT GCGCCCGCGAC GTCTTCTCCC GCTGGATAAA TGCCGCCCG
1560

GACGCCCG ACGCCGCACT CTCCTGAGCC CACGCCCGCG GCGCCGGGCT CGCTGTACGA
1620

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 780 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701-F9L Gen., Variante

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

60
5 GAGCACCTCG CGCGGCTGGT GCGCCGCGAC GTCTCTCCC GCTGGATAAA TGCCGCCGCG
120
10 CGTCTTCCTC GCGCGCTTCC TGCGCCAGCT GGCCGCGCGC GCGGCCGCGG CCTCGGCCGC
180
15 CTGCGCCGTG CGCGTGGGTG CGGTGCGCGG CGCCCTGCGG AACTGCGAGC TGGTGGTGGT
240
20 GAACCGCTGC CACGCGGACG CTGCCGGCGC GCTCGCGCTG GCCTCCGCGG CGCTGGCGGA
300
25 AACGCTGGCG GAGCTGCCGC GCGCGGACAG GCTCGCGTC GCGCGCGAGC TGGGCGTGGA
360
30 CCCAGAGCAC CCGGAGCTGA CGCCGGACCC CGCCTGCGCG GCGGAGAGCG CGCTTGCGCA
420
35 GAACATCGAC ATCCAGACGC TGGACCTGGG CGACTGCGGC GACCCAAAG GCCGCCGACT
480
40 GCGCGTGGCG CTGGTGAACA GCGGCCACGC GGCGCAAAC TGCGCGCTCG CGCGCGTAGC
540
45 GACCGCGCTG ACGCGCCGCG TGCCCGCAAG CGGGCACGGC CTCGCGGAGG GCGGCACGCC
600
50 GCGTGGACG CTGCTGCTGG CGGTGGCCGC GGTGACGGTG CTCAGCGTGG TGGCGGTTC
660
55 GCTGCTGCGG CGCGCGCTGC GGGTGCCTA CCAATTGCGG CGGCCGGCG CGCTGCGCGC
720
60 GTAGCCGCGC AAAATGTAAA TTATAACGCC CAACTTTAA GGGTGAGGCG CCATGAAGTT
780
65

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 423 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

60 (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Parapox ovis
- (B) STAMM: D1701 10kD-Genfragment

65 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

DE 196 39 601 A1

GGTACCGACA CTACAAGATC CTGCTCGACG TGAACCAGCC CGACAACTTT GTGATCTCCT 60
 5
 CTGCGAAGAC CTTCATCACC GTGAACGTGA TCGTGATGGT GCAGTTCCCTC GCGGACGTCA 120
 CGCTCGAGTT CGTGGCGCGC AACCTCTGCT TCGACATGCC GCCCGAGGCC GCGCACCTGG 180
 10
 CCACCGCTCG TGGAGAGCGC GAAGACTGTG CCGCGGGCGC GGACGTGGCC GAGTACGTGA 240
 ACGCGCTCAT CGCGGCCGAG CACGCGAAGC AGAAGTCGAC GCTGTCCAAG GAGGAGTTCC 300
 15
 GCTACGAGAT GCTCAGCAAC TTCCCTCCCGC ACATGCAGGA CAGCGCCAAC CAGCTCAAGG 360
 GCTTGTACCT GCTCTCGCTG GTGCGCAACA TGGTCTCTG CGTGTCTTC CCGAACCGGT 420
 20
 ACC
 423

Verzeichnis der Abbildungen 25

Abb. 1 zeigt die physikalische Karte des HindIII-I-Fragmentes aus Orf D1701 in den Plasmiden pORF-1/-2.
 Abb. 2 zeigt die physikalische Karte der HindIII-Restrikt. Enzym-Erkennungsstellen auf dem D1701-Genom.
 Abb. 3 zeigt die LacZ-Kassette mit dem an den 11K Promotor gekoppelten LacZ-Gen.
 Abb. 4 zeigt Plasmid pORF-PA, in das nach einer Deletion von 395 bp die 3,2 Kbp große LacZ-Kassette 30 eingesetzt wurde.
 Abb. 5 zeigt Plasmid pCE4 als Konstrukt aus pORF-PA und der LacZ-Kassette aus pGSRZ, deren Orientierung analog des VEGF-Genes ist.
 Abb. 6 zeigt Plasmid pCE5 als Konstrukt aus pORF-PA und der LacZ-Kassette, deren Orientierung entgegen dem VEGF-Gen läuft.
 Abb. 7 zeigt DNA-Fragmentmuster der Behandlung von pCE4 und pCE5 mit Restriktionsenzymen PVuII und SacI aufgetrennt in der Agarose-Gelelektrophorese.
 Abb. 8 zeigt Plasmid pORF1, in das nach Linearsierung durch X cm I die 3,2 Kbp große LacZ-Kassette inseriert wurde.
 Abb. 9 zeigt Plasmid pCE9/10, das aus dem Konstrukt von pORF1 und der LacZ-Kassette besteht. Das Insert 40 zeigt einen dem PKF 10 Gen analogen Verlauf.
 Abb. 10 zeigt schematisch die PCR-Mutagenese.
 Abb. 11 zeigt schematisch die Bal 31-vermittelte Deletion von DNA-Teilstücken.

Patentansprüche 45

1. Rekombinant hergestellte Parapockenviren (PPV) mit Insertionen und/oder Deletionen.
2. Rekombinant hergestellte Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen in Genomabschnitten, die nicht für die Virusvermehrung notwendig sind.
3. Rekombinant hergestellte Parapockenviren mit Insertionen und/oder Deletionen in Genomabschnitten, die für die Virusvermehrung notwendig sind.
4. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen in den Bereichen des Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen enthalten, die nicht exprimiert werden.
5. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen in den Bereichen des Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen enthalten, die exprimiert werden.
6. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß Ansprüchen 1 bis 5, wobei Insertionen und/oder Deletionen im Hind III-Fragment I des PPV-Stammes D1701 sowie seinen Varianten und Homologen oder der diesem Fragment entsprechenden DNA aus anderen Parapockenviren lokalisiert sind.
7. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des VEGF-Gens oder benachbart zu diesen enthalten.
8. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des PK-Gens oder benachbart zu diesen enthalten.
9. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des ITR-Ab schnittes oder benachbart zu diesen enthalten.
10. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich oder benachbart des Gens, das für das 10 KDa-Protein kodiert, enthalten.

11. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im Bereich des HD1R Gens oder benachbart zu diesem enthalten.

12. Rekombinant hergestellte Parapockenviren, die Insertionen und/oder Deletionen im oder benachbart zum F9L-Gen enthalten.

5 13. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen oder diesem Fragment entsprechende DNA aus anderen Parapockenviren.

14. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen enthält in Bereichen, die für die Virusreplikation notwendig sind.

10 15. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in Bereichen, die nicht für Virusreplikation notwendig sind, enthält.

16. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in den Bereichen enthält, die nicht für die Virusreplikation notwendig sind und die auf Bereichen liegen, die nicht exprimiert werden.

15 17. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das in diesem Fragment Deletionen und/oder Insertionen in den Bereichen enthält, die nicht für die Virusvermehrung notwendig sind und die auf Bereichen liegen, die exprimiert werden.

18. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das im oder benachbart zum VEGF-Gen dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.

20 19. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das im oder benachbart zum PK-Gen dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.

20 20. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das im oder benachbart zum ITR-Abschnitt dieses Fragments Deletionen und/oder Insertionen enthält.

25 21. Plasmid enthaltend Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das im oder benachbart zum Gen HD1R und/oder F9L-Gen Deletionen und/oder Insertionen enthält.

22. Plasmid enthaltend DNA-Fragment aus D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, das im oder benachbart zum Gen das für das 10 KDa-Protein kodiert Deletionen und/oder Insertionen enthält.

30 23. Plasmid enthaltenden Teil des Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, in welchem Deletionen und/oder Insertionen gemäß Ansprüchen 13 bis 22 enthalten sind.

24. Plasmid gemäß Ansprüchen 13 bis 23, wobei das Hind III-Fragment I aus PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen durch eine diesem Fragment entsprechende DNA aus anderen Parapockenviren ersetzt ist.

35 25. Plasmid gemäß Ansprüchen 13 bis 24, wobei das Hind III-Fragment I sowie seinen Varianten und Homologen vollständig oder nur zum Teil vorliegt.

26. Genomfragment Hind III-Fragment I von PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen oder Teile davon oder der diesem Fragment entsprechende Fragmente aus anderen Parapockenviren mit der Sequenz gemäß Sequenzprotokoll ID No 8.

40 27. DNA-Abschnitt oder Teile davon aus dem Hind III-Fragment I von PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen oder der diesen Abschnitt oder Teilen davon entsprechende Abschnitt aus anderen Parapockenviren, der für VEGF-Protein kodiert gemäß Sequenz-Protokoll ID1.

28. DNA-Abschnitt aus dem Hind III-Fragment I von PPV-Stamm D1701 sowie seinen Varianten und Homologen, der für PK-Protein kodiert gemäß Sequenz-Protokoll ID NO2 bzw. ID NO9 (Genvariante).

45 29. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren kodierend für Gen HD1R mit der Sequenz gemäß Sequenz-Protokoll ID NO3 sowie seinen Varianten und Homologen.

30. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren für F9L mit der Sequenz gemäß Sequenz Protokoll ID NO5 (F9L-Gen) sowie seinen Varianten (ID NO10) und Homologen.

31. DNA-Abschnitt oder Teile davon von Parapockenviren für den ITR-Bereich mit der Sequenz gemäß Sequenz-Protokoll ID4 (ITR-Bereich) sowie seinen Varianten und Homologen.

50 32. Genprodukte hergestellt auf Basis der Sequenzen der DNA-Abschnitte gemäß Ansprüchen 26 bis 31.

33. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß Ansprüchen 1 bis 12, die als Insertionen Fremd-DNA enthalten, welche für immunogene Bestandteile von anderen Erregern kodieren.

34. Rekombinant hergestellte Parapockenviren gemäß Ansprüchen 1 bis 12 und 33, die als Insertionen Fremd-DNA enthalten, welche für Immunmediatoren kodieren.

55 35. Verfahren zur Herstellung der Viren gemäß Ansprüche 1 bis 12, 33 und 34, dadurch gekennzeichnet, daß man die Plasmide gemäß Ansprüchen 13 bis 25 in an sich bekannter Weise mit Parapockenviren in Zellen rekombiniert und auf die gewünschten Viren selektiert.

36. Verfahren zur Herstellung der Plasmide gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß

60 1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,

2. sein Genom reinigt,

3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,

4. die erhaltenen Fragmente in Plasmide inseriert und

5. auf die Plasmide hin selektiert, die das Gen, das für das 10 KDa-Protein kodiert sowie seinen Varianten und Homologen enthalten, und

65 6. gegebenenfalls Insertionen und/oder Deletionen in das Gen kodierend für das 10 KDa-Protein einfügt.

37. Verfahren zur Herstellung der Plasmide gemäß Ansprüchen 13 bis 21 und 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß man

DE 196 39 601 A1

1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,
2. sein Genom reinigt,
3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,
4. die erhaltenen Fragmente in Plasmide inseriert und
5. auf die Plasmide hin selektiert, die das HindIIIi-Fragment sowie Varianten und Homologen oder diesem entsprechende Fragmente oder Bestandteile davon enthalten, und
6. gegebenenfalls Insertionen und/oder Deletionen in diese Fragmente in den erhaltenen Plasmiden einführt

38. Verfahren zur Herstellung des Hind IIIi-Fragments oder des DNA-Abschnittes, das für das 10 KDa-Protein kodiert, von PPV-Stamm D1701 oder des diesem Fragment oder Abschnitt entsprechenden Bereiches aus anderen Parapockenviren oder von Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man 5

1. einen geeigneten Parapockenvirusstamm auswählt,
2. sein Genom reinigt,
3. das gereinigte Genom mit Restriktionsenzymen behandelt,
4. und die gewünschten Fragmente oder Abschnitte selektiert oder 15
5. gegebenenfalls die erhaltenen Fragmente des Genoms zunächst in Plasmide insertiert, die Plasmide mit den gewünschten Fragmenten isoliert, diese Plasmide vermehrt und daraus die gewünschten Fragmente isoliert.

39. Verfahren zur Herstellung der Genprodukte gemäß Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die gemäß Anspruch 38 erhältlichen Fragmente in geeignete Expressionssysteme überführt und mittels dieser 20 Systeme die Gene exprimiert.

40. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren gemäß Ansprüchen 1 bis 12 in Impfstoffen.

41. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren gemäß Ansprüchen 1 bis 12 in Produkten, die sowohl immunisieren als auch die nicht-erregerspezifische Immunabwehr stimulieren. 25

42. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren in Immunmodulatoren, die die nicht-erregerspezifische Immunabwehr stimulieren.

43. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren für die heterologe Expression von Fremd-DNA.

44. Verwendung der rekombinant hergestellten Parapockenviren als Vektoren für Fremd-DNA. 30

45. Verwendung der Plasmide gemäß Ansprüchen 13 bis 25 zur Expression parapockenspezifischer Genomabschnitte.

46. Verwendung der Plasmide gemäß Ansprüchen 13 bis 25 zur Herstellung von diagnostischen Mitteln.

47. Verwendung der Genomfragmente gemäß Ansprüchen 26 bis 31 zur Herstellung von diagnostischen Mitteln. 35

48. DNA-Abschnitt sowie Varianten und Homologen gemäß Sequenz-Protokoll ID NO6 (Promotor des VEGF-Gens).

49. Verwendung des DNA-Abschnitts sowie Varianten und Homologen gemäß Anspruch 48 als Promotor für die Expression von DNA mit Parapockenviren. 40

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

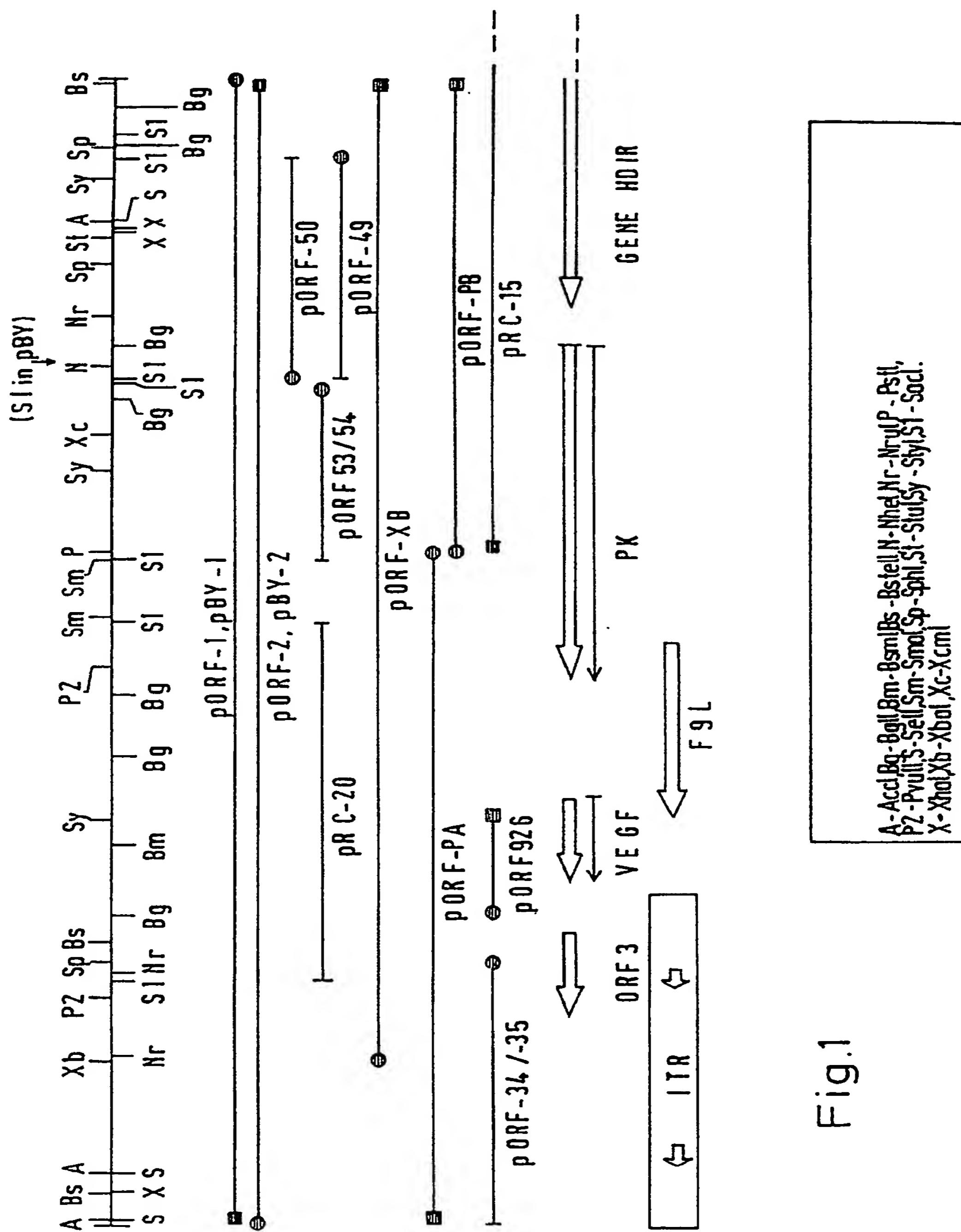
45

50

55

60

65



卷二

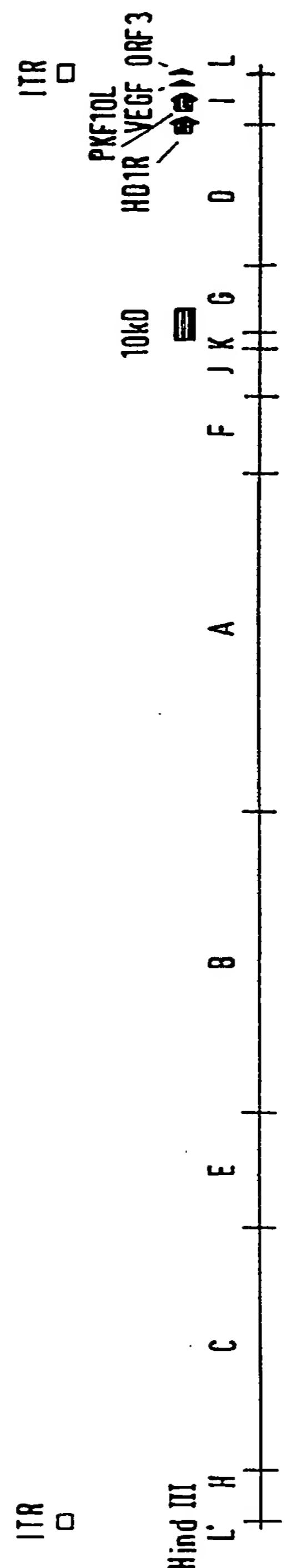
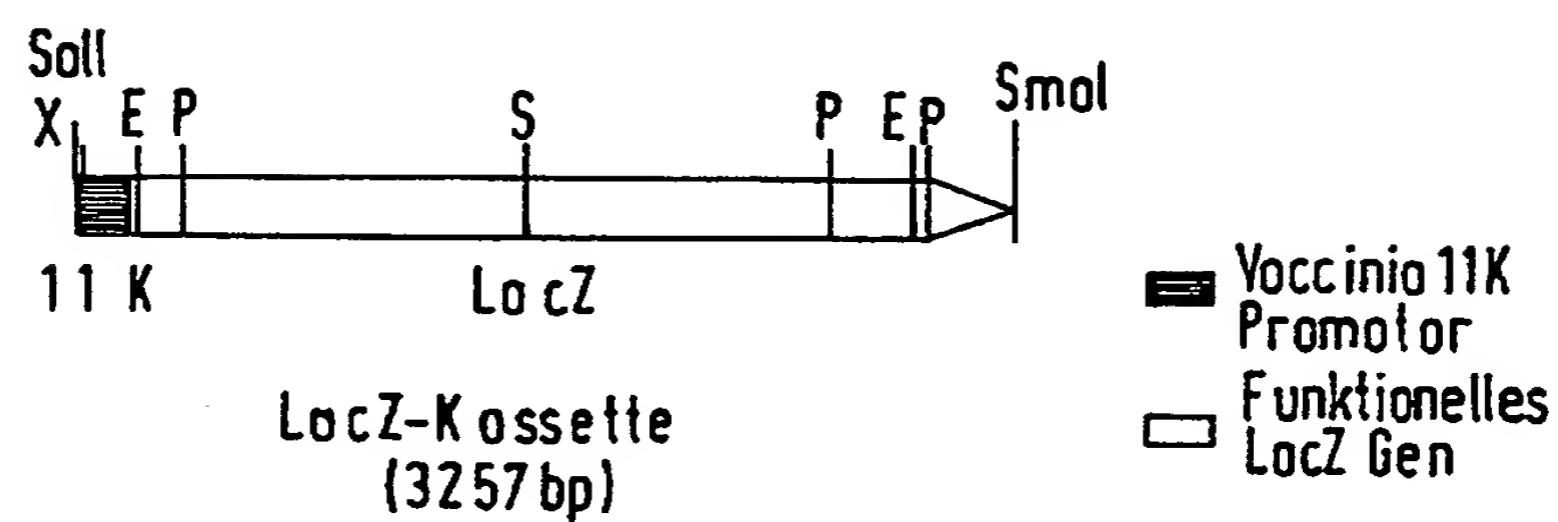


Fig.2

Fig.3



Restriktionsschnittstellen: EcoRI (E), PvuII (P), SacI (S) und XbaI (X).

Fig.4

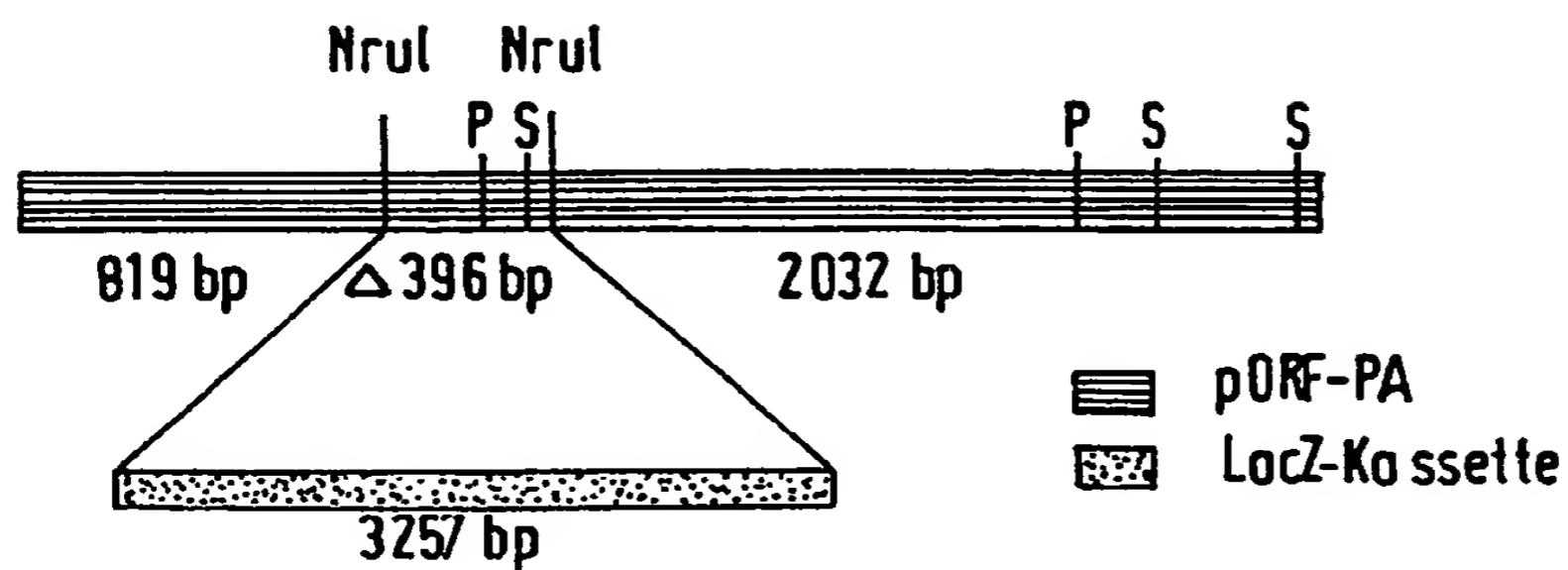


Fig.5

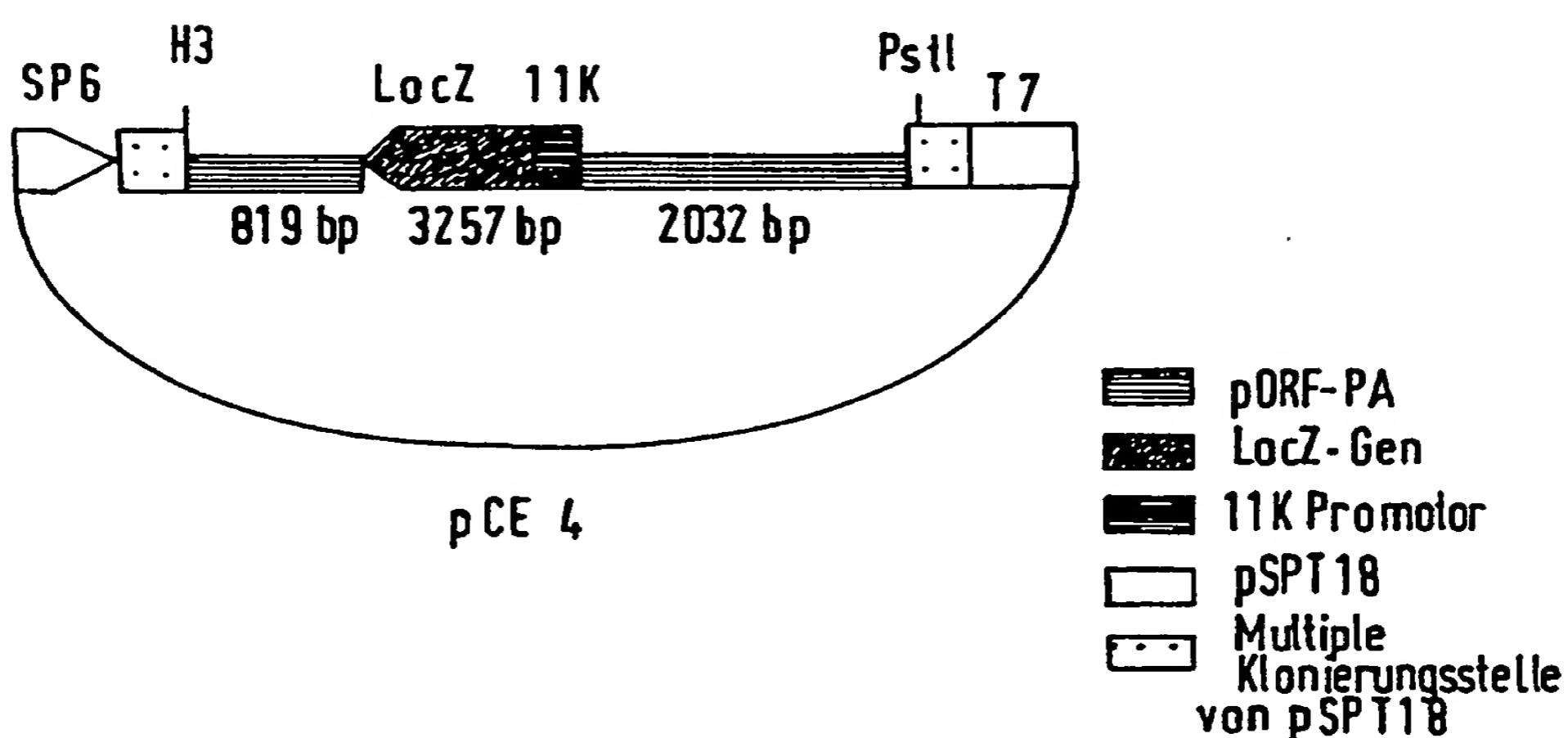
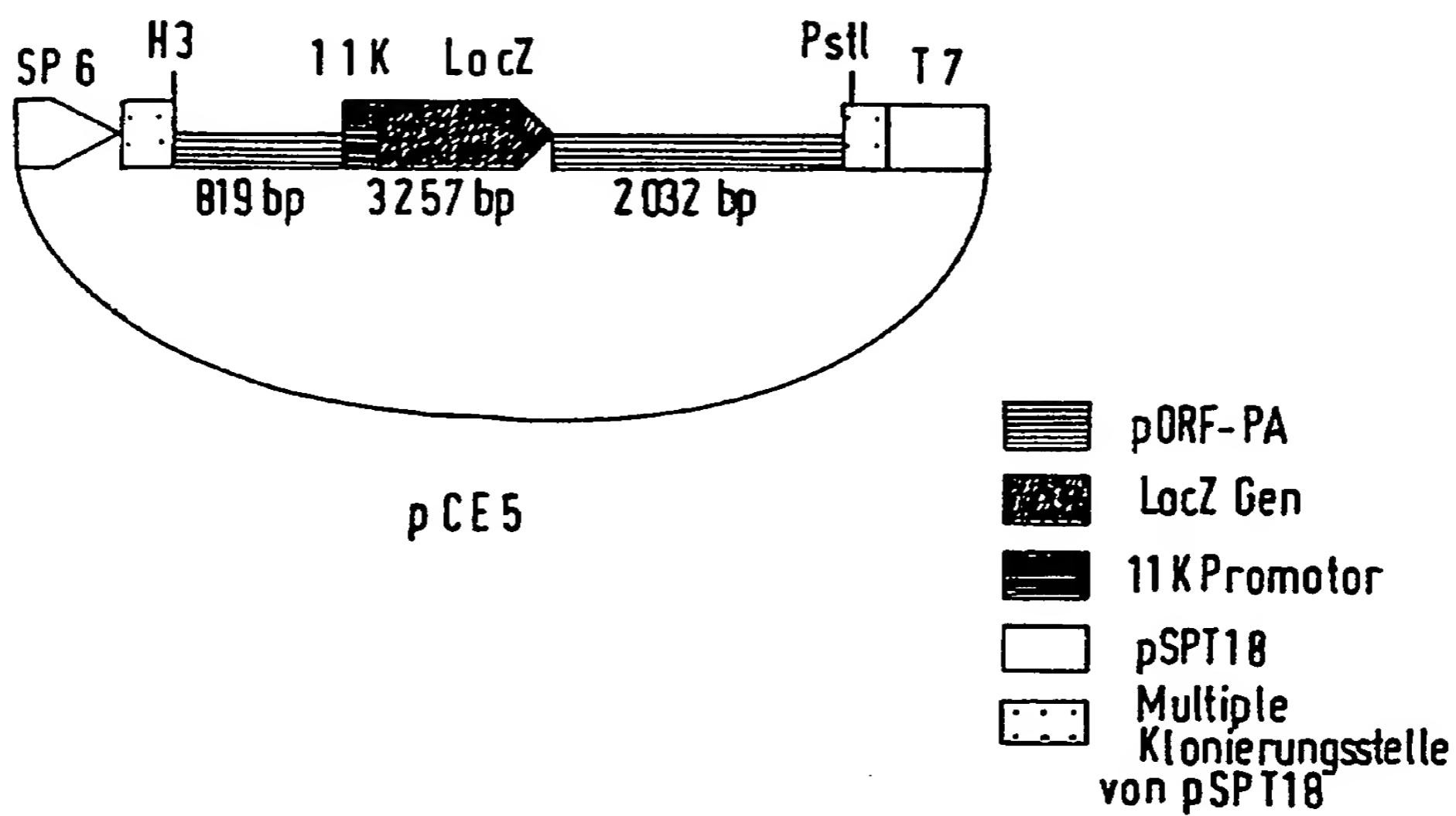
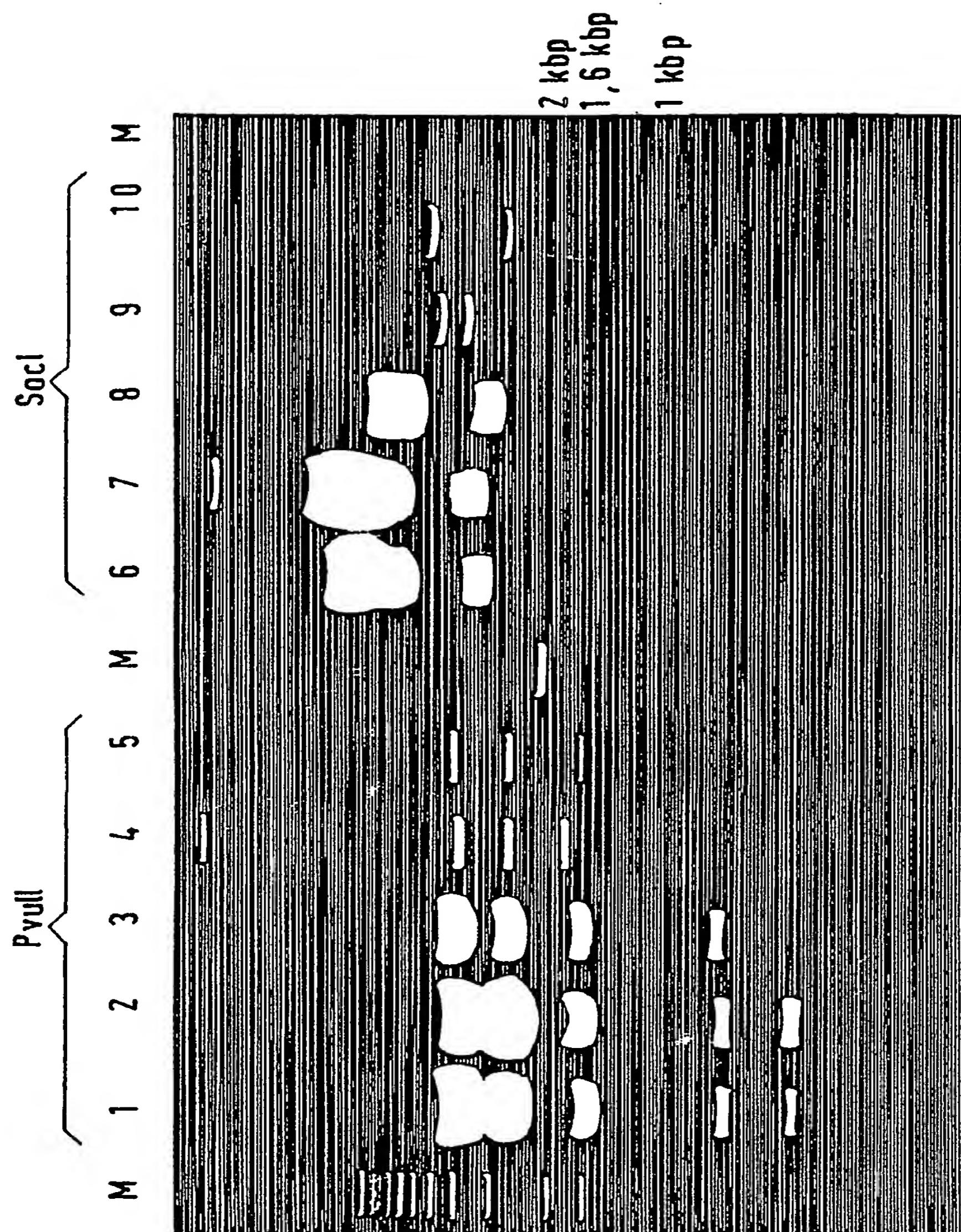


Fig.6



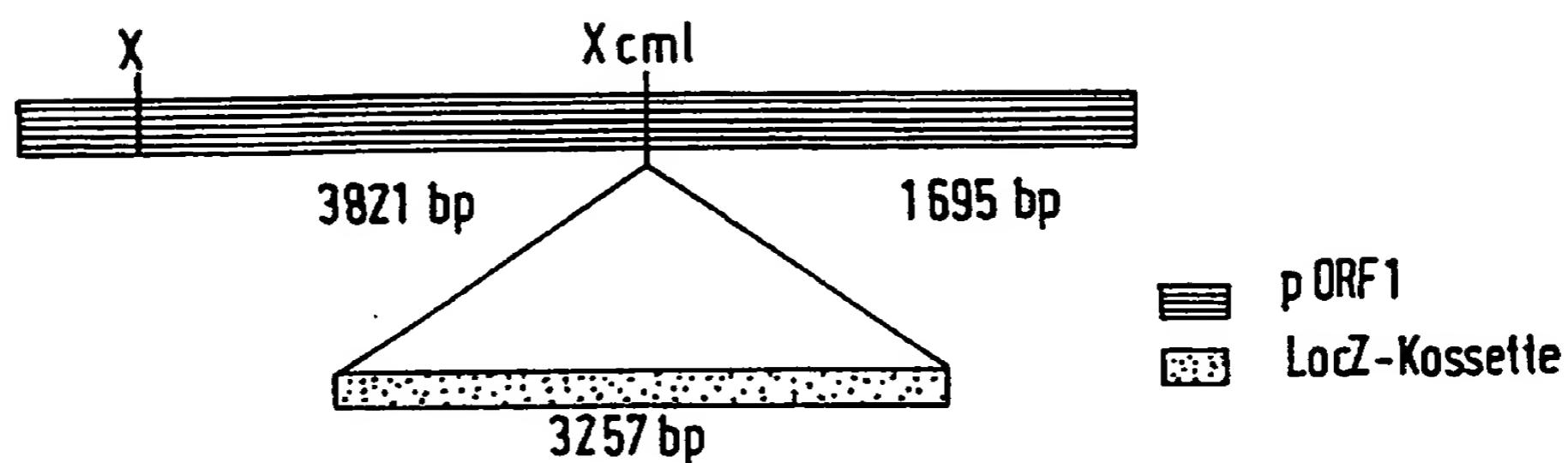
Plasmid pCE 5 als Konstrukt aus pORF-PA und der *lacZ*-Kosette, deren Orientierung entgegen dem VEGF-Gen verläuft;



Restriktionsenzymverdau mit PvuII (Spur 1-5) bzw. SacI
(Spur 6-10); Spur 4 u. 9 pCE 4, Spur 5 u. 10 pCE 5;
M = Molekulargewichtsmarker

Fig.7

Fig.8



X = Restriktionsenzymeschnittstelle von XbaI; EcoRI nicht vorhanden.

Fig.9

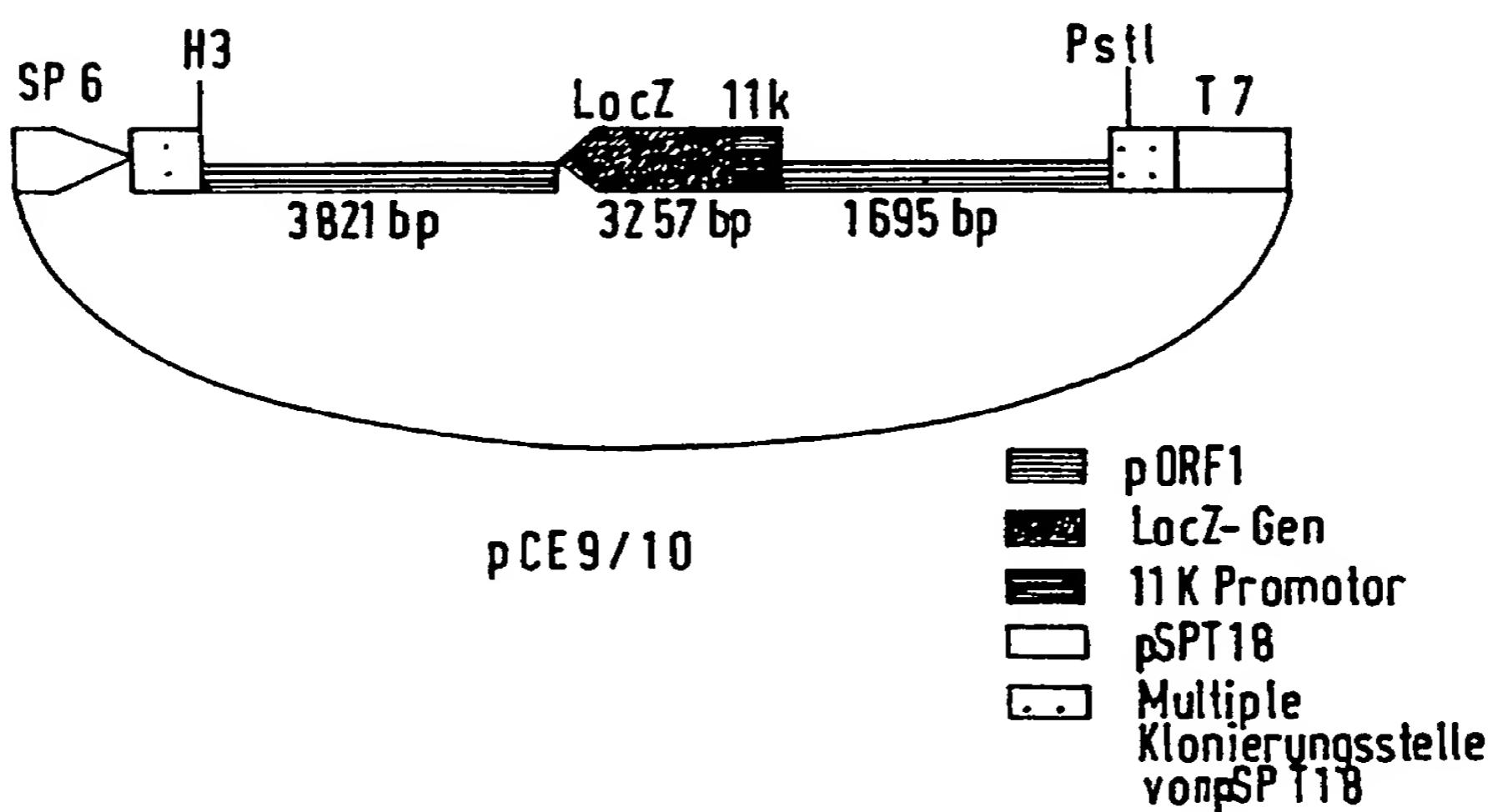
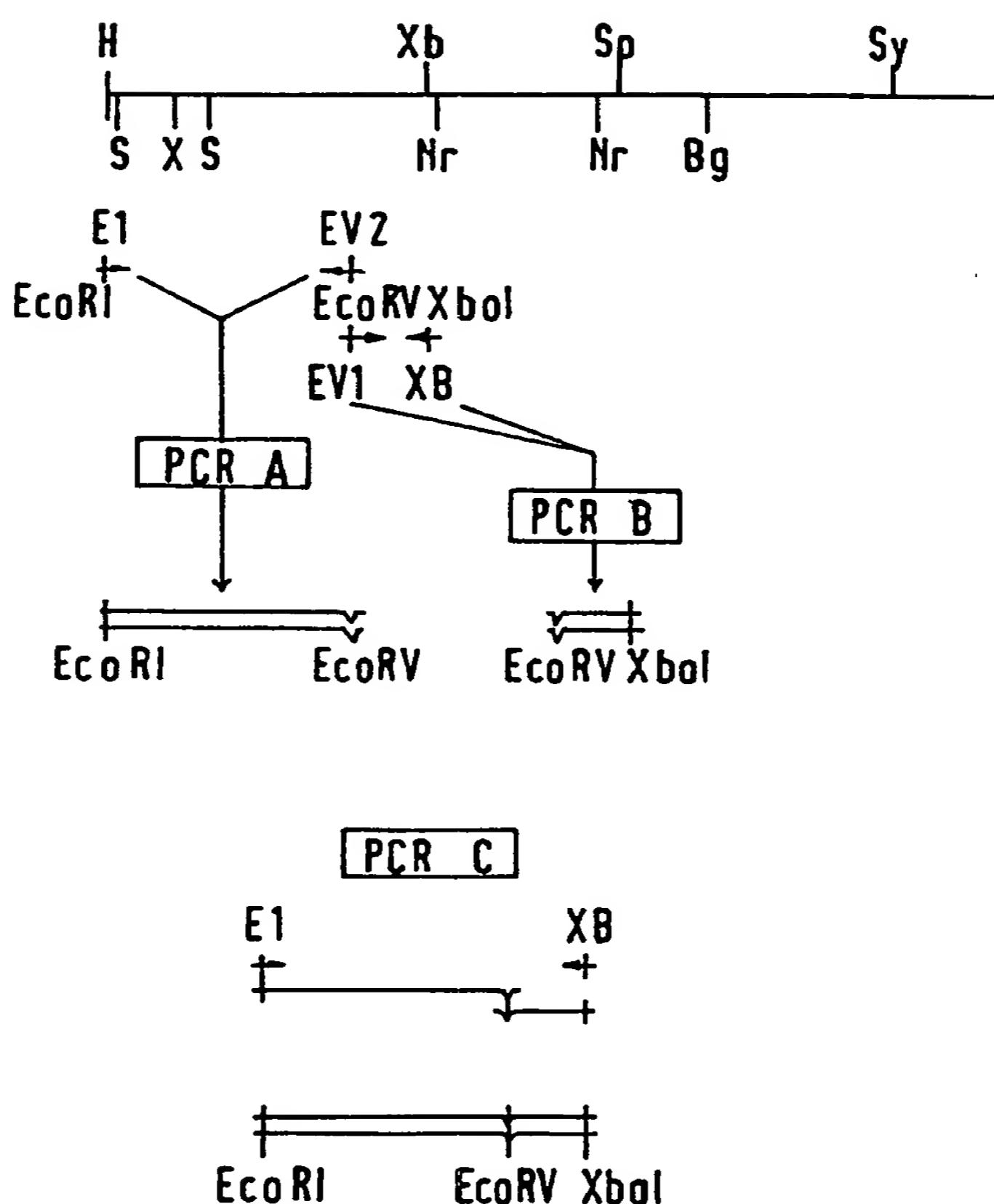


Fig.10



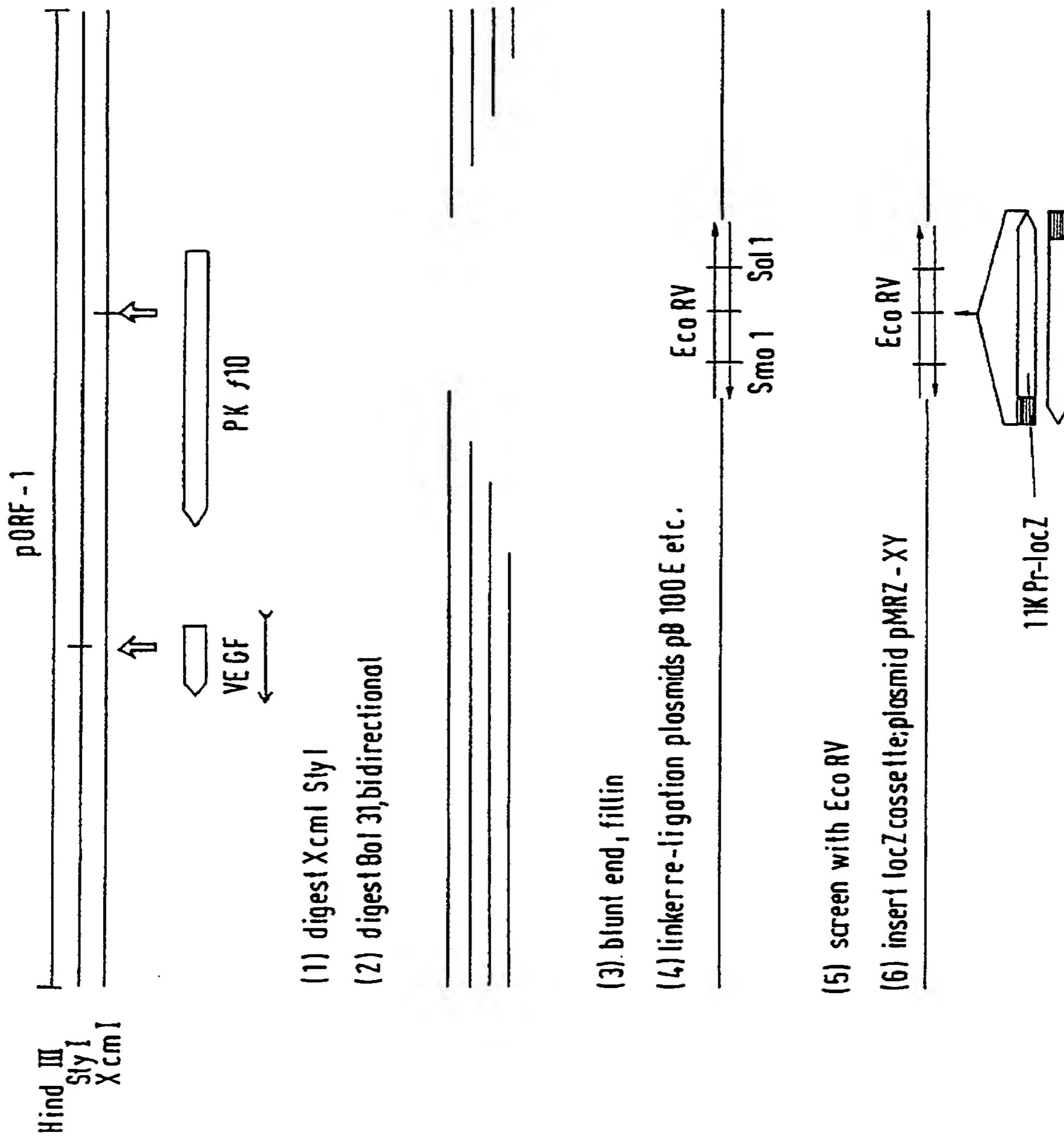


Fig.11